

胰岛素样生长因子-1 对高氧诱导的 A549 细胞凋亡的影响

金贞爱¹ 赵以坤² 金正勇¹ 祁海峰¹ Mokhles Wali Gul¹ 公明花¹

(1. 延边大学附属医院儿科, 吉林 延吉 133000; 2. 日照市人民医院新生儿科, 山东 日照 276800)

[摘要] **目的** 胰岛素样生长因子-1(IGF-1)具有促进细胞分化、抑制细胞凋亡等多种生物学活性。该研究旨在探讨 IGF-1 对高氧诱导的 A549 细胞凋亡的影响及其抗凋亡机制。**方法** 将传代培养的 A549 细胞暴露于高氧环境,并以不同浓度 IGF-1(1、10、100 ng/mL)干预 48 h,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞存活率,Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡变化,同时用流式细胞仪检测凋亡调控相关蛋白(Bax、Bcl-2)表达水平的变化。**结果** 高氧组细胞存活率为(51±3)%,IGF-1 干预组细胞存活率随着 IGF-1 药物浓度的递增逐渐升高,中、高剂量 IGF-1 干预组细胞存活率分别为(64±3)%和(88±4)%,与高氧组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。高氧组 A549 细胞凋亡率为(38.3±5.4)%,较空气组(2.4±0.9)%明显增多;高氧组 Bcl-2 的蛋白表达水平为(72±5)%,较空气组(91±4)%明显下降;高氧组 Bax 的表达水平为(54±6)%,较空气组(3±2)%明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与高氧组比较,IGF-1 干预组细胞凋亡率随着药物浓度的增加逐渐下降,分别为(16.1±4.7)%、(9.2±2.8)%和(6.9±2.5)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。与高氧组比较,IGF-1 干预组细胞 Bcl-2 的表达逐渐增高,分别为(79±4)%、(94±4)%和(100±5)%,而 Bax 的表达逐渐下降,分别为(26±4)%、(5±2)%和(4±2)%,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 高氧明显抑制 A549 细胞的增殖,促进其凋亡;IGF-1 具有促进 A549 细胞增殖,通过调节凋亡调控蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达,抑制高氧诱导的 A549 细胞凋亡的作用。

[中国当代儿科杂志,2013,15(6):490-493]

[关键词] IGF-1;高氧;细胞凋亡;A549 细胞

Effect of insulin-like growth factor-1 on hyperoxia-induced apoptosis in A549 cells

JIN Zhen-Ai, ZHAO Yi-Kun, JIN Zheng-Yong, QI Hai-Feng, Mokhles Wali Gul, GONG Ming-Hua. Department of Pediatrics, Yanbian University Hospital, Yanji, Jilin 133000, China (Email: kimzhenai1103@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To investigate the effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1), which can promote cell differentiation and inhibit cell apoptosis, on hyperoxia-induced apoptosis in A549 cells and its anti-apoptotic mechanism. **Methods** A549 cells were sub-cultured, exposed to hyperoxic conditions and were then treated with different concentrations of IGF-1 (1, 10, and 100 ng/mL) for 48 hours. Cell viability was measured by MTT assay. Cell apoptosis was evaluated by Annexin V-FITC/PI double-staining flow cytometry. Expression levels of Bax and Bcl-2 were measured by flow cytometry. **Results** The middle-dose and high-dose IGF-1 intervention groups had higher cell viabilities than the hyperoxic exposure group [(64±3)% and (88±4)% vs (51±3)%; $P<0.05$]. Compared with the air control group, the hyperoxic exposure group had a significantly higher apoptotic rate [(38.3±5.4)% vs (2.4±0.9)%; $P<0.05$], a significantly lower expression level of Bcl-2 [(72±5)% vs (91±4)%; $P<0.05$], and a significantly higher expression level of Bax [(54±6)% vs (3±2)%; $P<0.05$]. Compared with the hyperoxic exposure group, the low-dose, middle-dose, and high-dose IGF-1 intervention groups had significantly lower apoptotic rates [(16.1±4.7)%, (9.2±2.8)%, and (6.9±2.5)% vs (38.3±5.4)%; $P<0.05$], significantly higher expression level of Bcl-2 [(79±4)%, (94±4)%, and (100±5)% vs (72±5)%; $P<0.05$], and significantly lower expression level of Bax [(26±4)%, (5±2)%, and (4±2)% vs (54±6)%; $P<0.05$]. **Conclusions** Hyperoxia significantly inhibits proliferation and promotes apoptosis in A549 cells. IGF-1 may promote cell proliferation and inhibit hyperoxia-induced apoptosis in A549 cells by regulating the expression of Bcl-2 and Bax. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(6):490-493]

Key words: IGF-1; Hyperoxia; Apoptosis; A549 cell

[收稿日期]2012-10-18;[修回日期]2012-12-17
[作者简介]金贞爱,女,博士,副教授。

随着新生儿学的发展和机械通气的应用,高氧性肺损伤备受新生儿专家的关注。胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 是一类与胰岛素结构相类似的多肽生长因子,具有促进细胞分化、抑制细胞凋亡等多种生物学活性。IGF-1 在肺组织中的主要作用是促进肺的成熟与分化。IGF-1 的表达高峰出现于肺泡化早期,这有利于肺泡隔的形成及上皮细胞的成熟。

研究表明,长时间吸入高浓度氧,肺泡上皮细胞的凋亡增加,进而抑制肺泡化的进程。外源性 IGF-1 可以有效抑制肺泡上皮细胞的凋亡,减轻气道炎症反应,从而逆转肺发育阻滞^[1]。但 IGF-1 通过何种机制抑制高氧诱导的肺细胞凋亡,尚需进一步研究。

A549 细胞来源于人肺泡细胞癌,具有Ⅱ型肺泡上皮细胞的特性与表型^[2],故常被用于正常人肺泡Ⅱ型上皮细胞的发生、发展、分化及其结构与功能的研究^[3-4]。Ⅱ型肺泡上皮细胞是肺泡上皮细胞的干细胞,也是高氧性肺损伤的主要靶细胞。因此,本研究采用人 A549 细胞株为研究对象,探讨 IGF-1 抗高氧诱导的 A549 细胞凋亡机制,为 IGF-1 用于防治高氧性肺损伤提供实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

IGF-1 购自美国 Promega 公司;四甲基偶氮唑 (MTT) 购自美国 GIBCO 公司;流式细胞仪检测用凋亡调控相关蛋白 (Bcl-2、Bax) 试剂盒及 Annexin V-FITC/PI 试剂盒均购自美国 BD 公司。

1.2 细胞培养

A549 细胞株由中国医学科学院提供,37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内进行常规培养。

1.3 细胞分组及高氧暴露模型的建立

A549 细胞株分为以下 5 组:空气组、高氧组、高氧 + IGF-1 低剂量组、高氧 + IGF-1 中剂量组和高氧 + IGF-1 高剂量组。空气组细胞用含 10% 胎牛血清的 1640 细胞培养液常规培养。高氧组细胞放入高氧培养箱内,即向封闭培养箱内通入 O₂、CO₂ 及 N₂ 混合气(流量 5 L/min)共 30 min,当测得氧浓度为 80% ~ 85% 时封闭箱,再恒温细胞培养 48 h。药物干预组细胞在倒置相差显微镜下观察,待细胞融合至 40% ~ 50%,在高氧对照组同步的基础上加入不同浓度 IGF-1 干预(1 ng/mL、10 ng/mL 或 100 ng/mL)后继续培养 48 h。

1.4 实验方法

1.4.1 MTT 法检测细胞存活率 待培养 48 h 后,测定细胞存活率,波长设为 492 nm,测定吸光度 (A) 值。计算 A549 细胞存活率 (%) = 实验组 A 值/空白对照组 A 值 × 100%^[5],实验重复 3 次,取平均值。

1.4.2 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡 待培养 48 h 后,收集各组细胞悬液,检测过程严格按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作。所有样本避光,1 h 内上流式细胞仪检测。以上操作重复 3 次,取平均值。

1.4.3 流式细胞术检测 Bcl-2、Bax 表达 待培养 48 h 后,收集各组细胞悬液,检测过程严格按照 Bcl-2、Bax 检测试剂盒说明书进行操作。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计学分析,计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Bonferroni 比较法。Bcl-2/Bax 比值与细胞凋亡率的相关性采用线性相关分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IGF-1 对高氧暴露的 A549 细胞存活率的影响

高氧组 OD 值较空气组明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与高氧组相比,中、高剂量 IGF-1 干预组 OD 值随着 IGF-1 药物浓度的递增逐渐增大,分别为 0.55 ± 0.06 和 0.76 ± 0.06 ;中、高剂量组细胞存活率也逐渐升高,分别为 $(64 \pm 4)\%$ 和 $(88 \pm 4)\%$,与高氧组相比,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 IGF-1 对高氧暴露的 A549 细胞存活率的影响
($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	OD 值	存活率 (%)
空气组	6	0.86 ± 0.05	
高氧组	6	0.44 ± 0.03^a	51 ± 3
高氧 + IGF-1 低剂量组	6	0.45 ± 0.05	52 ± 4
高氧 + IGF-1 中剂量组	6	0.55 ± 0.06^b	64 ± 4^b
高氧 + IGF-1 高剂量组	6	0.76 ± 0.06^b	88 ± 4^b
F 值		35.3	128.8
P 值		<0.05	<0.05

a: 与空气组比较, $P < 0.05$; b: 与高氧组比较, $P < 0.05$

2.2 IGF-1 对高氧诱导的 A549 细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 凋亡相关蛋白表达的影响

空气组在细胞培养过程中,存在自发性凋亡,凋

亡平均水平 <5%。与空气组比较,高氧组细胞凋亡率明显升高,Bcl-2 蛋白的表达水平下降,Bax 的表达水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。IGF-1 干预组细胞凋亡率随药物浓度的递增而下降,Bcl-2 蛋白的表达逐渐增高,而 Bax 的表达水平逐渐下降,与高氧组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Bcl-2/Bax 的比值与细胞凋亡率成反比($r = -0.936, P = 0.012$)。见表 2。

表 2 不同剂量 IGF-1 对高氧诱导的 A549 的 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bcl-2(%)	Bax(%)	Bcl-2/Bax	凋亡率(%)
空气组	9	91 ± 4	3 ± 2	34.5 ± 4.3	2.4 ± 0.9
高氧组	9	72 ± 5 ^a	54 ± 6 ^a	1.3 ± 0.2 ^a	38.3 ± 5.4 ^a
高氧 + IGF-1 低剂量组	9	79 ± 4 ^b	26 ± 4 ^b	3.4 ± 0.5 ^b	16.1 ± 4.7 ^b
高氧 + IGF-1 中剂量组	9	94 ± 4 ^b	5 ± 2 ^b	19.4 ± 3.4 ^b	9.2 ± 2.8 ^b
高氧 + IGF-1 高剂量组	9	100 ± 5 ^b	4 ± 2 ^b	27.1 ± 3.3 ^b	6.9 ± 2.5 ^b
F 值		184.2	217.2	164.4	248.1
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

a: 与空气组比较, $P < 0.05$; b: 与高氧组比较, $P < 0.05$

3 讨论

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 已成为严重威胁婴儿健康的慢性肺疾病之一,是发达国家新生儿重症监护最棘手的问题。至今其发病机制尚未完全明确,临床上尚无疗效确切的药物。

目前,肺发育受阻滞的新型 BPD 备受新生儿专家的关注。BPD 的发生与 II 型肺泡上皮细胞的增殖、分化及凋亡密切相关。吸入高浓度氧仍然是 BPD 重要原因之一。II 型肺泡上皮细胞是肺泡上皮细胞的干细胞,也是高氧性肺损伤的主要靶细胞。研究表明,长时间吸入高浓度氧,可引起慢性肺损伤,从而使 Clara 细胞分泌蛋白的表达下降,肺泡上皮细胞的凋亡增加,进而抑制了肺泡化的进程^[1]。

IGF-1 作为一类结构与胰岛素相类似的多肽生长因子,不仅具有胰岛素样作用,还具有促进细胞分化、并能抑制细胞凋亡及血管形成等多种生物学活性^[6]。研究表明,外源性 IGF-1 可以有效抑制肺泡上皮细胞的凋亡,减轻气道炎症反应,从而逆转肺发育阻滞^[3]。但 IGF-1 通过何种机制抑制高氧诱导的肺细胞凋亡,尚需进一步研究。

II 型肺泡上皮细胞的损伤后增殖障碍与高氧肺损伤、肺发育受阻的发生发展息息相关^[7]。因 A549 细胞具有肺泡 II 型上皮细胞的特性与表型,国内外均有报道利用 A549 细胞进行高氧性肺损伤的细胞

研究^[8-11]。本实验采用人 A549 细胞株为实验对象,探讨 IGF-1 对高氧诱导的 A549 细胞体外增殖和细胞凋亡的影响,进一步揭示其可能的抗凋亡机制,为 IGF-1 参与 BPD 的预防与治疗提供实验和理论依据。

MTT 比色法是一种用来检测细胞的存活率和生长情况的方法,其主要特点为灵敏度高、经济、方便、快捷、重复性好、操作简便、无放射性污染^[12]。本实验结果显示,IGF-1 能改善高氧诱导 A549 细胞的生长抑制,对人 A549 细胞具有明显的增殖作用。IGF-1 有促进细胞增殖的效果,随着 IGF-1 药物浓度的增加促进细胞增殖的效果更加明显。有文献报道,IGF-1 作用呈剂量依赖性,有效浓度从 1 ng/mL 到 1000 ng/mL 不等。

本实验显示,IGF-1 对 A549 细胞具有凋亡抑制作用,尚未发现剂量浓度依赖性的上限。外源性 IGF-1 促进细胞分裂增殖的物质基础是位于细胞膜系统内的 IGF-1 受体和细胞间质中存在的 IGF-1^[13-14]。细胞中 IGF 受体数量与亲和力的高低可能是决定生长因子的最高有效浓度的最主要指标,而分离纯化后的 A549 细胞,没有其他各种细胞以及肺组织中各种因子的干扰,因而更易和生长因子发生结合。因而即使较小的用量就表现出了对 A549 细胞的活性,具有促进增殖的生物效应。

凋亡是由机体内各种环境变化激发所导致的细胞自身主动以及有序的死亡方式,在这一过程中涉及精确的基因转录以及蛋白质合成。Annexin V-FITC/PI 荧光双染标记法^[15-16]是用来区别早期凋亡与晚期凋亡的方法之一。本实验结果表明,高氧组 A549 细胞凋亡率明显高于空气组。IGF-1 干预组细胞凋亡率随 IGF-1 药物浓度的递增呈剂量依赖性降低。提示,IGF-1 对高氧诱导的 A549 细胞凋亡具有明显的抑制作用。

Bcl-2 家族与细胞凋亡密切相关。在线粒体上 Bcl-2 家族蛋白通过与其他凋亡蛋白协同作用调控线粒体结构与功能的稳定性。当上游信号激活 PI3K 的主要靶酶 Akt 活化的 Bcl-2 家族是重要的凋亡调控因子,Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族中两个重要成员,其分别代表作用相反的两组基因。Bcl-2 为原癌基因,编码一种分子量为 21 KDa 的促凋亡蛋白,能形成同源二聚体 (Bax/Bax),诱导细胞凋亡。正常情况下,Bax 则定位于胞浆中,而 Bcl-2 存在于线粒体中,Bcl-2 家族掌控着细胞线粒体膜的通透性,线粒体膜的通透性与细胞的生理状态息息相关。细胞的凋亡与否,决定于 Bcl-2/Bax 二者之间的比例,

Bcl-2 基因的过度表达,不仅抑制 Bax/Bax 促凋亡活性;反之,Bax 高表达而 Bcl-2 低表达,将促进凋亡进行。Bax 的表达水平比 Bcl-2 高时,Bax-Bax 所形成的同型二聚体占优势,从而诱导细胞的凋亡增加;当 Bcl-2 的表达水平比 Bax 高的时候,Bax-Bax 同型二聚体发生解离,会形成更为稳定的 Bcl-2-Bax 异型二聚体,从而起到“中和”Bax 所致的诱导凋亡作用,从而使细胞继续得以存活^[17]。Bcl-2/Bax 比值下调是多种因素诱导细胞凋亡的共同途径。

在 IGF-1 抑制细胞凋亡的多条信号途径上均有 Bcl-2 家族蛋白的参与。本实验结果表明,与空气组相比,高氧组的 Bcl-2 的表达强度明显减弱,Bax 表达增强,且 Bcl-2/Bax 的表达百分比和细胞凋亡抑制率呈显著正相关。而 IGF-1 干预后 Bcl-2 的表达显著增强,Bax 表达减弱,Bcl-2/Bax 的比值均增大,且出现剂量依赖性效应。由此可得出的结论是,IGF-1 可通过调节凋亡调控蛋白 Bax 与 Bcl-2 的比率,从而实现其对高氧诱导的 A549 细胞凋亡起保护作用,进一步促进肺发育。

总之,高氧抑制 A549 细胞的生长,促进其凋亡。IGF-1 可减轻高氧抑制 A549 细胞增殖的作用。IGF-1 是通过调节凋亡调控蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达,实现其对高氧诱导的 A549 细胞凋亡的抑制作用。

[参 考 文 献]

[1] 金贞爱,金正勇,池永学,鲁继荣. 重组人胰岛素样生长因子 1 对高氧暴露下新生大鼠肺组织 Clara 细胞分泌蛋白表达的影响[J]. 中华儿科杂志,2007, 45(5): 369-373.

[2] Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells[J]. Int J Cancer, 1976, 17(1): 62-70.

[3] Park S, Lee YK, Jung M, Kim KH, Chung N, Ahn EK, et al. Cellular toxicity of various inhalable metal Nano-Particles on human alveolar epithelial cells[J]. Inhal Toxicol, 2007, 19(1):

59-65.

[4] Tian D, Zhu M, Li J, Ma Y, Wu R. Cigarette smoke extract induces activation of beta- catenin/TCF signaling through inhibiting GSK3beta in human alveolar epithelial cell line[J]. Toxicol Lett, 2009, 187(1): 58-62.

[5] 朱逸,贡力,钮洪艳. 探讨 MG132 对人肺腺癌 A549 细胞凋亡的影响及其机制[J]. 中国医药导报,2011,8(34): 32-34.

[6] 刘真喜,付庭焕,赵彤. IGF-1 与细胞凋亡的研究进展[J]. 医学综述,2001,7(10):579-580.

[7] 王华,李文斌,常立文. Mateigel 胶对高氧损伤早产鼠肺泡 II 型细胞黏着斑激酶表达变化及其对 II 型肺泡上皮细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中华儿科杂志,2012,50(2): 141-145.

[8] Ogunlesi F, Cho C, McGrath-Morrow SA. The effect of glutamine on A549 cells exposed to moderate hyperoxia[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1688(2): 112-20.

[9] 金正勇. 重组 Clara 细胞分泌蛋白对高氧性肺损伤的影响及其机制研究[D]. 延边大学,2007.

[10] 邹丹. Omi/HtrA2 信号通路介导高氧诱导肺泡上皮细胞凋亡的作用及机制[D]. 泸州医学院,2011.

[11] 邹新艳,董文斌,邹丹,李清平,雷小平,翟雪松,等. mitoKATP 通道开放剂对高氧诱导人 A549 细胞凋亡的保护作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(6): 514-517.

[12] Hebishima T, Matsumoto Y, Watanabe G, Soma G, Kohchi C, Taya K, et al. Oral administration of immunopotentiator from pantoea agglomerans 1 (IP-PA1) improves the survival of B16 melanoma-inoculated Model mice[J]. Exp Anim, 2011, 60(2):101-109.

[13] 徐燕,汤锦波. 核因子-K B 诱导激酶和 IK B 激酶在碱性成纤维细胞生长因子作用下 基因表达及肌腱细胞增殖[J]. 中华创伤杂志, 2003, 19(6): 348-351.

[14] 张兆锋,商庆新,曹道林. 体外培养肌腱细胞功能老化的观测[J]. 中国临床康复,2002, 6(22): 3376-3377.

[15] Sun F, Liu JY, He F, Liu Z, Wang R, Wang DM, et al. In-vitro antitumor activity evaluation of hyperforin derivatives[J]. J Asian Nat Prod Res, 2011, 13(8): 688-699.

[16] Yang L, Zhou X, Yang J, Yin X, Han L, Zhao D. Aspirin inhibits cytotoxicity of peptide PrP106-126 to neuronal cells assoicated with microglia activation in vitro[J]. J Neuroimmunol, 2008, 199(1-2): 10-17.

[17] Gradilone A, Gazzaniga P, Ribuffo D, Scarpa S, Cigna E, Vasaturo F, et al. Survivin, bcl-2, bax, and bcl-X gene expression in sentinel lymph nodes from melanoma patients[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(2): 306-312.

(本文编辑:钟乐)