

· 实验研究 ·

高氧和脂多糖诱导人胚肺成纤维细胞 NF-κB 的动态表达

章晓婷, 刘坚, 余肖, 宁琴, 罗小平

(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的 近年研究表明, 支气管肺发育不良的发生与宫内炎性因子暴露和出生后机械通气、高氧暴露有着密切的联系。该研究选取人胚肺成纤维细胞, 模拟炎性暴露和高氧暴露环境, 探讨高氧和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 对人胚肺成纤维细胞核转录因子 NF-κB 表达的影响。**方法** 60% 高氧, LPS (100 ng/mL) 及两者同时刺激人胚肺成纤维细胞 0.5, 1, 2 及 4 h, 用免疫细胞化学观察其亚基 p50 及 p65 的核转位, RT-PCR 方法检测 NF-κB p50 和 p65 mRNA。**结果** LPS 的直接刺激迅速诱导 p50 及 p65 的核转位, 0.5 h 即可致 NF-κB 迅速活化, 1 h 达到高峰, 后逐渐下降; 高氧刺激诱导 p50 及 p65 核转位, 1 h 达高峰, 之后迅速下降; 高氧和 LPS 联合刺激 p50 及 p65 亚基核转位, 在 2 h 达高峰, 然后缓慢下降。但 4 h 时活化效应明显高于 LPS 组和高氧组。**结论** 同时暴露于高氧和 LPS 组人胚肺成纤维细胞中 NF-κB 的活化比单独暴露因素下活化更为显著, 活化持续时间更长, 提示暴露于宫内炎性环境中的患儿生后又高氧/辅助通气更容易导致肺部疾病。

[中国当代儿科杂志, 2008, 10(5): 661 - 664]

[关键词] 高氧; 脂多糖; NF-κB; 支气管肺发育不良; 人胚肺; 成纤维细胞

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2008)05 - 0661 - 04

Lipopolysaccharide and hyperoxia induce nuclear factor-kappa B expression in human embryo lung fibroblasts *in vitro*

ZHANG Xiao-Ting, LIU Jian, YU Xiao, NING Qin, LUO Xiao-Ping. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Luo X-P, Email: xpluo@tjh.tjmu.edu.cn)

Abstract: Objective The development of bronchopulmonary dysplasia (BPD) is attributed to intrauterine inflammatory and postnatal mechanical ventilation and hyperoxia. The present study was aimed to investigate the effects of lipopolysaccharide (LPS) and hyperoxia exposure on the nuclear factor-kappa B (NF-κB) expression in human embryo lung fibroblasts (HELFs) *in vitro*. **Methods** Either LPS (100 ng/mL) or hyperoxia (60%), or a combination of both was employed to stimulate confluent HELFs. After 0.5, 1, 2 and 4 hrs of stimulation, the nuclear translocation of two subunits p50 and p65 in HELFs was detected with immunocytochemistry. Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to measure mRNA expression of NF-κB p50 and p65. **Results** LPS or hyperoxia stimulation induced the nuclear translocation of p50 and p65 at 30 minutes of exposure. mRNA expression of NF-κB p50 and p65 peaked at 1 hr and then gradually decreased. A stimulation of LPS combined with hyperoxia induced the nuclear translocation of p50 and p65. NF-κB p50 and p65 mRNA expression peaked at 2 hrs of stimulation and then decreased slowly, but was significantly higher than that in the LPS or hyperoxia stimulation alone group 4 hrs after stimulation. **Conclusions** Both LPS and hyperoxia exposure induced NF-κB activation in the HELFs *in vitro*. Hyperoxia combined with LPS induced a more prolonged duration of NF-κB activation. This suggests that the individuals who were subjected to intrauterine inflammation and postnatal hyperoxia exposure are more vulnerable to lung injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(5): 661 - 664]

Key words: Hyperoxia; Lipopolysaccharide; NF-kappa B; Bronchopulmonary dysplasia; Human embryo lung; Fibroblast

核转录因子 NF-kappaB (NF-κB) 是可被多种刺激因素强烈激活的一类核信号, 它的活化可诱发大量炎症相关因子的表达, 在急慢性肺损伤的发病过程中发挥着重要作用^[1]。支气管肺发育不良 (bron-

[收稿日期] 2008 - 02 - 01; [修回日期] 2008 - 03 - 18
[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2005CB522507)。
[作者简介] 章晓婷, 女, 硕士研究生。主攻方向: 新生儿疾病。
[通讯作者] 罗小平, 教授, 博士生导师, 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 邮编: 430030。

cho-pulmonary dysplasia, BPD),是早产儿吸入高浓度氧,机械通气治疗和肺部感染后最常见的合并症,是一种常见慢性肺部疾病。研究证明在急性慢性肺损伤后弥漫性肺泡损伤,成纤维细胞的增殖和肺纤维化在肺的重建过程中具有特征性。本文研究 NF- κ B p50 和 p65 在高氧和内毒素的干预下体外培养的人胚肺成纤维细胞中的动态表达,旨在探讨 NF- κ B 在支气管肺发育不良炎症级联反应中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

①细胞株:人胚肺成纤维细胞(由本院儿科临床病毒研究室惠赠,为其自制人胚肺成纤维细胞。取妊娠3个月药物流产胚胎肺组织,按常规原代细胞培养方法制备,传代10~15代用于实验);②DMEM高糖培养基(GIBCO公司),加入含100 U/mL青霉素,100 μ g/mL链霉素,HEPPES 2.38 g/L,NaHCO₃ 2.5 g/L,及10%胎牛血清(杭州四季青);③主要试剂:免疫组化SP试剂盒购自北京中山生物技术公司。胰蛋白酶购自GIBCO公司,抗p50,p65抗体购自武汉博士德,LPS购自美国SIGMA公司,引物由上海生工合成;④主要实验仪器:细胞培养箱,Sub-Cell GT琼脂糖凝胶电泳仪(BIO-RAD公司,美国),图像扫描仪(OLYMPUS,日本),PCR扩增仪(Biometra,德国),凝胶成像分析系统(UVP,英国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,3 d时0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 实验分组 取生长良好的人胚肺成纤维细胞,生长至80%融合时用于实验。弃去培养基,用无血清培养基培养24 h后,随机分为4组:I对照组;II LPS组;III 60%高氧组(以下简称“高氧”);IV LPS+60%高氧组(以下简称“LPS+高氧”)。每个干预因素5个标本。其中II,IV组培养液中按照100 ng/mL加入LPS放入培养箱中刺激0.5,1,2,4 h;III,IV组放入60%氧气,5% CO₂,37℃培养箱中0.5,1,2,4 h。

1.3 免疫细胞化学

常规细胞爬片固定,免疫组化SP法,DAB染色。阴性对照用血清稀释液代替一抗。细胞爬片所用载玻片均通过多聚赖氨酸处理以防脱片。

1.4 RT-PCR

总RNA的提取按Trizol试剂(Invitrogen)说明书步骤进行。刺激细胞至预定时间点,用冷PBS冲

洗,每10 cm²细胞加入Trizol 1 mL。提取总RNA以此为模板行PCR扩增。PCR引物序列及扩增片段见表1。反应条件为预变性94℃×5 min,变性94℃×45 s,退火温度55℃×40 s,延伸72℃×45 s,32个循环,终末延伸72℃×10 min。产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像系统观察拍照分析,分别测定目的基因与内参照 β -actin PCR产物条带的光密度值,并计算二者的比值作为目的基因的相对表达量。每组实验至少重复3次。

表1 各引物的碱基序列

Gene	Length (bp)	Primer sequence (5' to 3')
b-actin	564	Up CTGGGACGACATGGAGAAAA
		Down AAGGAAGGCTGGAAGACTGC
p50	414	Up TGACAGTAAAGCCCCCAATG
		Down CTACCACGCGCGAACTATC
p65	342	Up AGCATCCCAGGCGAGAGG
		Down CCGCACAGCATTCAGGTCGTA

1.5 统计学分析

测定结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 14.0软件对实验结果进行统计分析,采用重复测量数据的两因素多水平分析, $P < 0.05$ 为显著性检验标准。

2 结果

2.1 免疫细胞化学实验

NF- κ B亚基p50及p65免疫细胞化学显示,正常培养条件下,p65及p50主要位于胞浆中,因而胞浆中呈强阳性染色。LPS和高氧分别刺激均能诱导p65和p50亚基核转位,LPS刺激在0.5 h时即可观察到p65及p50亚基明显的核转位,胞核胞浆中均有阳性染色;高氧浓度刺激后,0.5 h可观察到核转位。LPS+高氧联合刺激时,可见核转位的时间延迟,在4 h时仍可见胞核强阳性染色(图1)。

2.2 LPS刺激NF- κ B的mRNA表达

分别对LPS干预0.5,1,2 h及4 h,应用RT-PCR检测NF- κ B p65 mRNA与p50 mRNA的表达,LPS直接刺激迅速诱导p50及p65的核转位,暴露0 h时与对照组相比差异无显著性,暴露0.5,1,2,4 h活化效应均明显高于对照组($P < 0.05$)。NF- κ B的活化随时间关系如下:0.5 h即可活化,p50 1 h达到高峰,然后迅速下降;p65 0.5 h活化即达高峰,然后随暴露时间延长活化迅速下降(图2~4)。

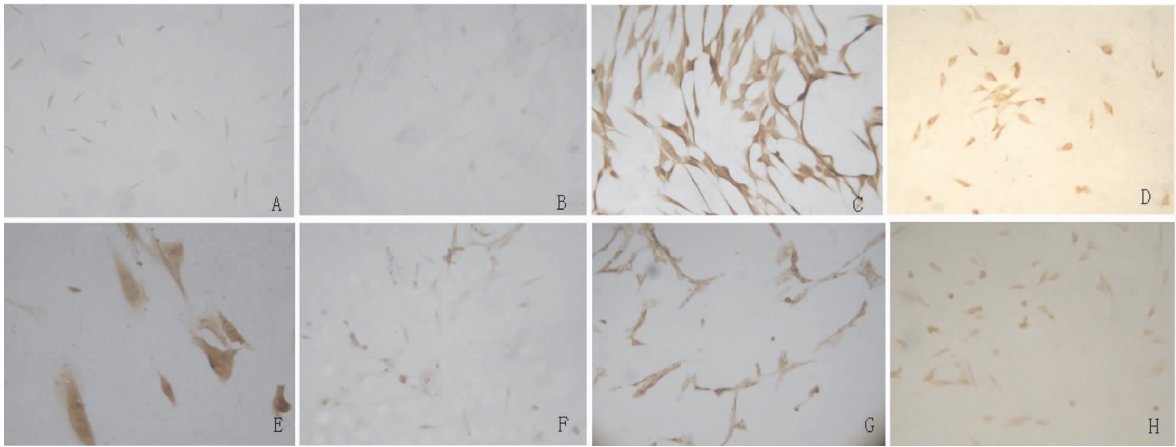


图1 人胚肺成纤维细胞 NF-κB p50 及 p65 免疫细胞化学(免疫组化 SP 法 × 200)。A、C、E 和 G 分别表示对照组,LPS 0.5 h,60% 高氧 2 h 及 LPS、60% 高氧联合刺激 1 h 时 NF-κBp50 的表达;B、D、F 和 H 分别表示对照组,LPS 0.5 h,60% 高氧 2 h 及 LPS、60% 高氧联合刺激 1 h 时 NF-κB p65 的表达。

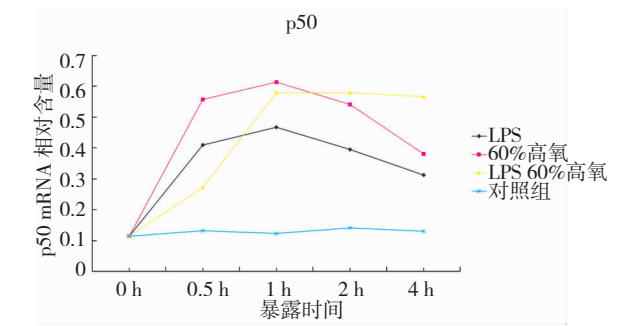


图2 不同时间点不同干预下人胚肺成纤维细胞 NF-κB p50 mRNA 的表达情况

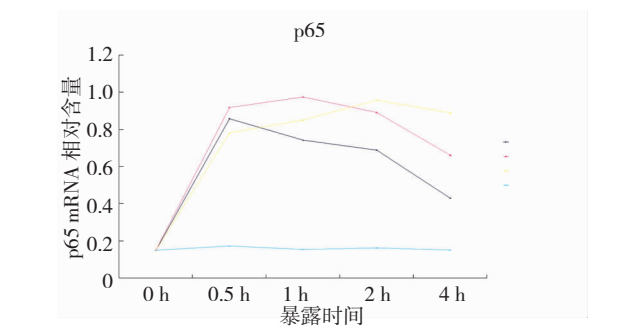


图3 不同时间点不同干预下人胚肺成纤维细胞 NF-κB p65 mRNA 的表达情况

2.3 60%高氧干预下 NF-κB 的 mRNA 表达

60% 高氧干预 0.5、1、2 h 及 4 h 后, NF-κB p65mRNA 与 p50 mRNA 刺激 0 h 时与对照组相比差异无显著性,刺激 0.5、1、2、4 h 活化效应明显高于对照组 ($P < 0.05$)。NF-κB 的活化随时间关系如下:p50 及 p65 在 0.5 h 即可看到活化,在 1 h 达到高峰,然后随暴露时间延长迅速下降,在 4 h 时接近低水平(见图 2、3、4)。

2.4 LPS 及 60% 高氧联合干预下 NF-κB 的 mRNA 的表达

LPS 和 60% 高氧联合刺激诱导 NF-KB 的活化,刺激 0 h 时与对照组相比无显著差异,其他时间点活化效应明显高于对照组 ($P < 0.05$),4 h 时活化效应明显高于 LPS 组和高氧组 ($P < 0.05$)。NF-κB 的活化随时间关系如下:p50 及 p65 在 0.5 h 即可见活化,p50 在暴露 1 h 达峰,后随暴露时间延长,活化依然持续,4 h 时仍可见其活化效应;p65 在暴露 2 h 活化达峰,后随暴露时间延长,活化效应依然持续呈缓慢下降(图 2、3、4)。

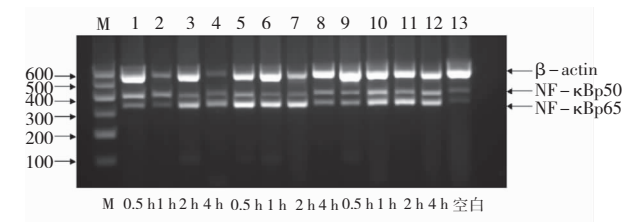


图4 不同时间点不同干预下人胚肺成纤维细胞 NF-κB p65 mRNA 和 p50 mRNA 的表达情况

注:M 为 Marker;1~4 为 LPS 组;5~8 为高氧组;9~12 为 LPS + 高氧组。13 为 0 h 时的对照组。

3 讨论

支气管肺发育不良是 1967 年 Northway 等^[3]首次提出的概念,是继发于严重呼吸窘迫综合征的一种慢性肺病^[4]。近年来,随着新生儿重症监护水平的提高,提出了新型 BPD 的概念^[11],即部分患儿在出生时可缺乏严重呼吸窘迫综合征的症状或较轻,但出生后 1 周内对氧和辅助通气的需求逐渐增加。

以往对于 BPD 的研究多在活体内用高氧和内毒素干预而进行研究,对于体外培养的细胞研究较少,对肺成纤维细胞研究更少。已有研究证明 p53, p21, Fas, Fas 配体和其他凋亡调节蛋白在肺损伤和肺纤维化的病理生理方面发挥重要的作用^[7]。本实验采用人胚肺成纤维细胞,此细胞直接来源于妊娠 3 个月药物流产胚胎,比既往用鼠来源的体外培养的细胞建造的细胞模型更进一步地接近人胚肺发育的生理情况。实验用 LPS 干预体外培养的细胞,诱导 NF- κ B 的活化,在 0.5 h 即可看到核转位,1 ~ 2 h 达到高峰,后随时间下降。采用高氧刺激细胞,细胞 NF- κ B 的活化达到高峰后也呈迅速下降趋势。这与以往报道^[5,6]在体内用 LPS 和高氧均能单独诱导急性肺炎反应结果相一致。在急性肺损伤的修复过程中,主要依靠肺泡上皮细胞的修复和以成纤维细胞为主的间叶细胞的繁殖。两者之间关系密切,相互依赖,互相调节。因此在肺发育过程、肺损伤和修复中,成纤维细胞发挥了重要的作用^[8]。

早产肺正处于肺泡形成的关键时期,氧疗或感染更易对正处于增殖活跃期的肺部细胞产生抑制和损害作用。人们逐渐认识到不仅高氧,宫内炎症暴露,早产,营养不良及通气形式等均能通过氧化应激引起持久的肺损伤。在氧化应激的作用下,线粒体通透性发生改变,ROS 产生增多,从而激活 NF- κ B, NF- κ B 激活后通过调控细胞因子,粘附分子,一氧化氮, MMPs 等的表达,对 BPD 的发生发展起着重要作用。

本实验中采用 LPS 和 60% 高氧联合刺激后, NF- κ B 的活化在最初呈递增关系,达到高峰时间明显延迟,并且达峰后并不迅速下降,而呈缓慢下降。说明了在两个刺激因素联合作用下, NF- κ B 的活化比单独因素刺激活化显著,而且有时间依赖关系,暴露的时间长,可能导致 NF- κ B 活化增加。

NF- κ B 是参与炎症反应的一个重要信号转导分子,多为 RelA (p65) 和 NF- κ B I (p50) 的异源二聚体。NF- κ B 通常与抑制蛋白 I- κ B α 结合成无活性的形式存在于胞质中,当其受到氧化剂、细菌、毒素或前炎症细胞因子(如 TNF- α , IL-1)的刺激后被激活,经历快速磷酸化后被非特异性蛋白酶水解,从而使 Rel 蛋白的核定位信号暴露, NF- κ B 快速移动到核内,结合在被诱导的基因启动子序列上与之相同的 κ B 位点,导致转录增加。本研究证明,同时暴露于高氧和 LPS 中, NF- κ B 的活化效应和持续时间明显增加,可能是因为高氧和 LPS 作为两个刺激因素,分别作用于不同的位点,导致转录增加。已有国外

研究表明 NF- κ B 与肺部急慢性炎症密切相关^[9,10]。NF- κ B 参与许多因子基因的转录调控,与免疫反应、炎症、癌形成有着密切的关系,而这些因子在许多疾病中表达水平明显增高,提示 NF- κ B 在炎症发病机制中的作用。对此的研究有利于解释暴露于宫内炎症环境中的患儿生后又高氧/辅助通气更容易引起肺部损伤,从而导致 BPD 的发生。

总之,本实验成功采用高氧和 LPS 诱导人胚肺成纤维细胞 NF- κ B 的动态表达模型,证明了高氧和 LPS 联合诱导下 NF- κ B 的活化比高氧和 LPS 单独刺激时活化显著,且无 LPS 和高氧单独诱导时在暴露时间的后半期呈明显下降的趋势。推测肺感染合并高氧损伤比单独因素刺激在急性肺损伤中起着更加重要的调节作用。研究炎症反应与肺发育之间的信号传导通路,有助于阐明新型 BPD 发生的分子机制,宫内环境及肺部早期的炎症级联反应的检测及干预措施值得更进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases [J]. J Clin Invest, 2001, 107(1): 7-11.
- [2] 廖玲洁, 罗小平. 支气管肺发育不良研究的新进展[J]. 中华儿科杂志, 2004, 3(42): 231-233.
- [3] Northway WH, Rosan RC, Porter DY. Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline membrane disease: bronchopulmonary dysplasia[J]. N Engl J Med, 1967, 276(7): 357-368.
- [4] Bland RD, Albertine KH, Carlton DP, Kullama L, Davis P, Cho SC, et al. Chronic lung injury in preterm lambs: abnormalities of the pulmonary circulation and lung fluid balance[J]. Pediatr Res, 2000, 48(1): 64-74.
- [5] 李玉祥, 罗小平, 廖玲洁, 刘皖君, 宁琴. 高氧对新生大鼠肺 caspase-3 和 p53 基因表达及肺细胞凋亡的影响[J]. 中华儿科杂志, 2005, 8(43): 585-590.
- [6] 蔡栩栩, 杜悦, 尚云晓, 金婧, 卢岩, 韩玉昆. 脂多糖致新生大鼠肺出血, 肺组织细胞间黏附分子 1 和核因子 κ B 抑制蛋白表达的变化[J]. 中华围产医学杂志, 2004, 9(7): 301-304.
- [7] Kuwano K, Hagimoto N, Kawasaki M, Hara N. The roles of apoptosis in lung injury and fibrosis [J]. Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi, 1998, 36(9): 739-744.
- [8] 赵洪文. 肺成纤维细胞在肺纤维化的作用[J]. 国外医学·呼吸系统分册, 1996, 16(3): 116-119.
- [9] Linda V, Gert DW, Sofie N, Wim VB, Guy H. Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor- κ B p65 subunit [J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(5-6): 963-970.
- [10] Christman JW, Sadikot RT, Blackwell TS. The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases [J]. Chest, 2000, 117(5): 1482-1487.
- [11] Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(7): 1723-1729.

(本文编辑: 吉耕中)