

香菇多糖对白介素-1β 诱导人胚肺
成纤维细胞表型转化的影响

金龙腾 张和 李昌崇 张维溪 林立

(温州医学院附属育英儿童医院呼吸科, 浙江 温州 325027)

[摘要] 目的 研究白介素-1β(IL-1β)对人胚肺成纤维细胞(FB)向肺肌成纤维细胞转化的影响及香菇多糖(LNT)的作用。方法 体外培养人胚肺 FB,用不同浓度 IL-1β 和 LNT 作用于细胞后,采用 CCK-8 法检测细胞的增殖情况,免疫细胞化学染色检测 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA),RT-PCR 检测纤维连接蛋白(FN)、I 型胶原蛋白(Col I)和 α-SAM mRNA 的相对表达量。结果 ①IL-1β 组细胞增殖的吸光度、α-SMA 蛋白及 FN、Col I 和 α-SAM mRNA 表达均高于对照组($P < 0.01$),且随着 IL-1β 浓度的增加,表达逐渐增高。②LNT 呈浓度依赖性抑制 IL-1β 诱导的细胞增殖及 α-SMA 蛋白、FN、Col I 和 α-SAM mRNA 表达($P < 0.01$)。结论 LNT 可抑制 IL-1β 诱导人胚肺 FB 增殖和肌成纤维细胞转化及细胞外基质积聚。 [中国当代儿科杂志,2011,13(4):331-335]

[关键词] 香菇多糖; 白介素-1β; α-平滑肌肌动蛋白; 细胞外基质; 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(2011)04-0331-05

Effects of lentinan on interleukin-1β-induced transdifferentiation of human embryonic lung fibroblasts to myofibroblasts

JIN Long-Teng, ZHANG He, LI Chang-Chong, ZHANG Wei-Xi, LIN Li. Department of Respiratory Disease, Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical Collage, Wenzhou, Zhejiang 325027, China (Li C-C, Email: wzlichch@21cn.com)

Abstract: Objective To study the effects of interleukin-1β (IL-1β) on transdifferentiation of human embryonic lung fibroblasts to myofibroblasts and the effects of lentinan on the transdifferentiation. **Methods** The human embryonic lung fibroblasts were cultured *in vitro*, and fibroblasts were treated with different concentrations of IL-1β and lentinan. The proliferation activity of the human embryonic lung fibroblasts was evaluated by the Cell Counting Kit-8 (CCK-8). The expression of α-smooth muscle actin (α-SMA) protein was measured by immunocytochemistry. The levels of fibronectin (FN), type I collagen (Col I) and α-SMA mRNA were detected by RT-PCR. **Results** Compared with the untreated control group, the absorbance value of cell proliferation, α-SMA protein levels, FN, Col I and α-SMA mRNA expression were significantly up-regulated after different concentrations of IL-1β (0.1, 1, 10 ng/mL) treatment for 48 hrs ($P < 0.01$). Lentinan treatment inhibited up-regulation of the cell proliferation activity, α-SMA protein levels, FN, Col I and α-SMA mRNA expression induced by IL-1β in a dose-independent manner ($P < 0.01$). **Conclusions** Lentinan can suppress human embryonic lung fibroblast proliferation, fibroblast-myofibroblast transdifferentiation and extra cellular matrix synthesis induced by IL-1β. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (4):331-335]

Key words: Lentinan; IL-1β; α-smooth muscle actin; Extra cellular matrix; Human embryonic lung fibroblast

气道重塑是支气管哮喘(简称哮喘)特征性病理改变之一,且与哮喘的严重程度密切相关。成纤维细胞(fibroblast,FB)是哮喘发生气道重塑的主要细胞之一,在慢性气道炎症作用下,可增生并向肌成纤维细胞转化,产生大量细胞外基质沉积于基底膜,导致上皮下网状层增厚、管腔狭窄,致使气道发生重塑^[1-2]。近年来,中药香菇多糖(lentinan, LNT)作为 T 淋巴细胞特异性免疫佐剂,参与机体的免疫调节^[3],受到越来越大的关注。国内学者发现 LNT 可缓解哮喘大鼠气道炎症反应^[4],但 LNT 对于哮喘气道重塑的作用未见报道。本研究通过观察 LNT 对白介素(IL)-1β 诱导人胚肺 FB 增殖及纤维连接蛋白(FN)、I 型胶原蛋白(Col I)和 α-平滑肌肌动蛋白(α-SAM)的表达的影响,探讨 LNT 在防治哮喘中

[收稿日期]2010-10-20;[修回日期]2010-12-23
[基金项目]国家自然科学基金资助(30973232)。
[作者简介]金龙腾,男,硕士研究生。
[通信作者]李昌崇,教授。

作用。

PCR 引物序列见表 1。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚肺 FB MRC-5 细胞株(第 4 代 ATCC);LNT 注射剂(南京康海药业有限公司生产,生产批号: H10950078);重组人 IL-1β(美国 R&D 公司);Trizol 总 RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司);CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所);cDNA 第一链合成试剂盒(北京天根生化科技有限公司);α-SMA 单克隆抗体、免疫组化二抗试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);胎牛血清和 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);PCR 引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 MRC-5 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(100 U/ml 青、链霉素)中,置于 37℃、5% CO₂ 孵箱,培养至 80% 融合时,换用无血清培养基同步化处理细胞 24 h。取 7~15 代细胞用于实验。

1.2.2 不同浓度 IL-1β 对 MRC-5 细胞的影响

(1)实验分组:实验分为对照组(未干预组)和 IL-1β 组,IL-1β 组再根据加入 IL-1β 浓度不同分为 3 个亚组,分别加入浓度为 0.1 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL IL-1β 作用 48 h。(2)CCK-8 法检测不同浓度 IL-1β 对 MRC-5 细胞增殖的影响:每组设 6 个复孔,每孔加入 10 μL CCK-8 细胞计数试剂,于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 1 h,酶标仪测定 450 nm 波长下吸光度(OD450)值。(3)SABC 法检测不同浓度 IL-1β 对 MRC-5 细胞 α-SMA 蛋白表达的影响:各组细胞制成细胞爬片后,4% 多聚甲醛固定,一抗 α-SMA 1:200 稀释,按试剂盒说明书操作,胞浆内棕黄色沉淀为阳性细胞。应用 image-pro plus 图像分析软件测定阳性细胞的平均光密度值(MOD),以代表蛋白表达水平。(4)RT-PCR 测定不同浓度 IL-1β 对 MRC-5 细胞 FN、Col I 和 α-SAM mRNA 表达:以 Trizol 法提取各组细胞总 RNA,逆转录成 cDNA 后行 PCR 扩增。PCR 反应体系总 25 μL,扩增条件为 94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,适当温度退火 30 s(其中 FN 57℃,Col I 63℃,α-SAM 60℃),72℃ 延伸 30 s,进行 30 个循环,最后延伸 72℃ 5 min。β-actin 随目的基因条件扩增。产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用 smartview 凝胶数字成像系统扫描分析。以目的基因与内参的吸光度比值代表其 mRNA 的相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

	名称	引物序列	大小(bp)
FN	上游引物	TAGCCCTGTCCAGGAGTTCA	346
	下游引物	CTGCAAGCCTTCAATACTCA	
Col I	上游引物	GTCTTCCTGGCCCTCTCGTG	391
	下游引物	TCGCCCTGTTCGCCCTGTCTCA	
α-SAM	上游引物	GCGTGGCTATTCTTCGTTAC	331
	下游引物	CATAGTGGTGCCCCCTGATAG	
β-actin	上游引物	CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT	204
	下游引物	GGAGCAATGATCTTGATCTT	

1.2.3 不同浓度 LNT 预处理对 MRC-5 细胞的影响

(1)实验分组:将 MRC-5 细胞分为对照组(未干预)、IL-1β 组(加入 10 ng/ml IL-1β 作用 48 h)、LNT 组(LNT 预处理 1 h 后加入 + 10 ng/mL IL-1β 作用 48 h),LNT 组再根据 LNT 浓度不同分 3 个亚组,加入浓度为 4 μg/mL、0.4 μg/mL、0.04 μg/mL 的 LNT;采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性,免疫细胞化学染色检测 α-SMA 表达,RT-PCR 检测 FN、Col I 和 α-SAM mRNA 表达。

1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析(ANOVA),方差齐者两两比较采用 LSD 检验,方差不齐者用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-1β 对 MRC-5 细胞增殖活性的影响

本研究发现,随着 IL-1β 浓度的增加,MCR-5 细胞 OD450 逐渐增高($F = 51.498, P < 0.01$),提示 MCR-5 细胞的增殖与 IL-1β 呈明显的浓度依赖性,IL-1β 对 MRC-5 细胞增殖有促进作用(表 2)。

表 2 不同浓度 IL-1β 对细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD450
对照组	6	0.961 ± 0.021
IL-1β 组		
0.1 ng/mL	6	1.042 ± 0.014 ^a
1 ng/mL	6	1.110 ± 0.006 ^{a,b}
10 ng/mL	6	1.185 ± 0.007 ^{a,b,c}
F 值		51.498
P 值		< 0.01

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与 0.1 ng/mL IL-1β 组比较, $P < 0.01$; c: 与 1 ng/mL IL-1β 组比较, $P < 0.01$

2.2 IL-1β对MRC-5细胞FN、Col I、α-SAM mRNA和α-SAM蛋白的影响

RT-PCR结果显示,正常肺FB有低水平的FN、Col I及α-SAM mRNA表达。加入不同浓度IL-1β 48 h后, FN、Col I及α-SAM mRNA较对照组水平升高,其中10 ng/mL IL-1β组α-SAM及Col I mRNA Col I水平明显高于0.1 ng/mL IL-1β组($P<0.01$) (表3)。

α-SAM免疫化学染色结果与RT-PCR结果相似,未刺激的对照组肺FB内α-SAM轻度表达,呈丝状分布。不同浓度IL-1β刺激后,α-SAM蛋白表达较对照组明显升高,且随着IL-1β浓度增加,蛋白表达逐渐增多,其中10 ng/mL IL-1β组α-SAM蛋白表达明显高于0.1 ng/mL IL-1β组($P<0.01$) (图1、表3)。

表3 IL-1β对MRC-5细胞FN、Col I及α-SAM表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	α-SAM		FN mRNA	Col I mRNA
		蛋白	mRNA		
对照组	6	0.250 ± 0.004	0.625 ± 0.032	0.643 ± 0.033	0.468 ± 0.034
IL-1β组					
0.1 ng/mL	6	0.271 ± 0.002 ^a	0.833 ± 0.032 ^a	0.890 ± 0.077	0.687 ± 0.057
1 ng/mL	6	0.280 ± 0.003 ^a	0.959 ± 0.052 ^a	0.946 ± 0.092 ^a	0.900 ± 0.094 ^a
10 ng/mL	6	0.287 ± 0.002 ^{a,b}	1.070 ± 0.041 ^{a,b}	1.113 ± 0.058 ^a	1.007 ± 0.077 ^{a,b}
F值		37.711	22.503	8.023	11.811
P值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a: 与对照组比较, $P<0.01$; b: 与0.1 ng/mL IL-1β组比较, $P<0.01$

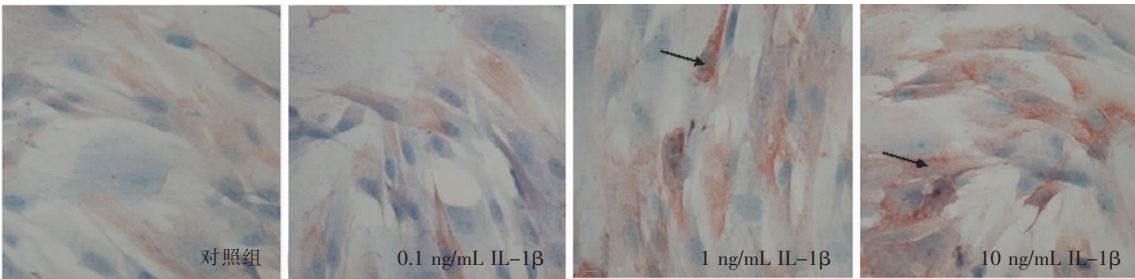


图1 IL-1β对MRC-5细胞α-SAM蛋白表达的影响(SABC, ×400) 对照组α-SAM蛋白有微量表达;不同浓度IL-1β组中,随着IL-1β浓度增加,染色逐渐加深,阳性细胞也逐渐增多,即α-SAM蛋白表达量逐渐增加。箭头所指胞浆内棕黄色沉淀为阳性结果。

2.3 不同浓度LNT对MRC-5细胞增殖活性的影响

本研究发现,LNT组MRC-5细胞OD450值明显低于IL-1β组,与对照组比较差异无统计学意义;不同浓度LNT组之间差异也无统计学意义($F=15.600$, $P<0.01$) (表4)。

2.4 不同浓度LNT对MRC-5细胞FN、Col I、α-SAM mRNA和α-SAM蛋白的影响

RT-PCR结果显示,不同浓度LNT预处理细胞后, FN、Col I及α-SAM mRNA表达较IL-1β组均明显降低($P<0.01$),而且随着LNT浓度增加, FN、Col I及α-SAM mRNA表达逐渐下降(见图2、表5)。

α-SAM免疫化学染色显示,LNT预处理可抑制IL-1β引起的α-SAM的表达,且与LNT呈浓度依赖

性的减少(见图3、表5)。

表4 LNT预处理对MRC-5细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

级别	n	OD450
对照组	6	0.996 ± 0.019
IL-1β组	6	1.180 ± 0.011 ^a
LNT组		
4 μg/mL	6	1.030 ± 0.021 ^b
0.4 μg/mL	6	1.045 ± 0.024 ^b
0.04 μg/mL	6	1.054 ± 0.023 ^b
F值		15.600
P值		<0.01

a: 与对照组比较, $P<0.01$; b: 与IL-1β组比较, $P<0.01$

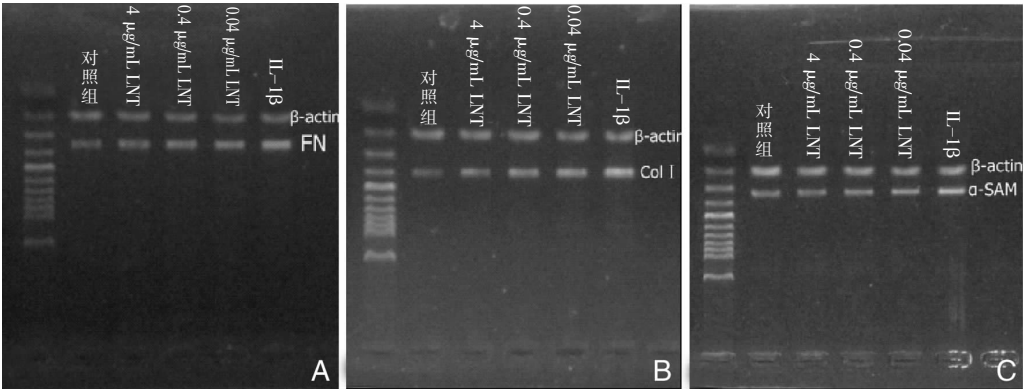


图2 RT-PCR检测LNT预处理对MRC-5细胞FN、Col I及α-SAM mRNA表达的影响 A:FN mRNA表达; B: Col I mRNA表达; C:α-SAM mRNA表达。IL-1β组FN、Col I及α-SAM mRNA表达较对照组明显增加;不同浓度LNT组可抑制IL-1β诱导的FN、Col I及α-SAM mRNA表达量的上调。

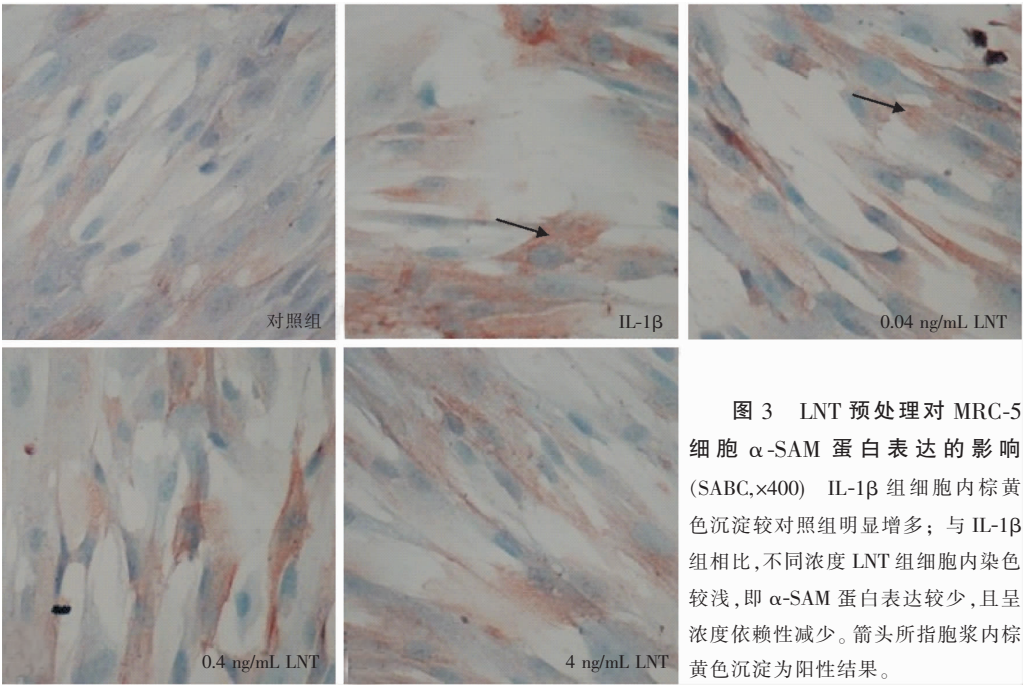


图3 LNT预处理对MRC-5细胞α-SAM蛋白表达的影响 (SABC,x400) IL-1β组细胞内棕黄色沉淀较对照组明显增多;与IL-1β组相比,不同浓度LNT组细胞内染色较浅,即α-SAM蛋白表达较少,且呈浓度依赖性减少。箭头所指胞浆内棕黄色沉淀为阳性结果。

表5 LNT预处理对MRC-5细胞FN、Col I及α-SAM表达的影响 (x̄±s)

组别	n	α-SAM		FN mRNA	Col I mRNA
		蛋白	mRNA		
对照组	6	0.255 ± 0.002	0.513 ± 0.068	0.606 ± 0.016	0.270 ± 0.023
IL-1β组	6	0.286 ± 0.002 ^a	1.106 ± 0.041 ^a	1.674 ± 0.046 ^a	0.929 ± 0.056 ^a
LNT组					
0.04 μg/mL	6	0.278 ± 0.002 ^{a,b}	0.817 ± 0.065 ^{a,b}	1.054 ± 0.046 ^{a,b}	0.536 ± 0.036 ^{a,b}
0.4 μg/mL	6	0.272 ± 0.001 ^{a,b}	0.674 ± 0.096 ^b	0.953 ± 0.033 ^{a,b}	0.369 ± 0.033 ^b
4 μg/mL	6	0.260 ± 0.002 ^{b,c,d}	0.592 ± 0.075 ^b	0.704 ± 0.034 ^{b,c,d}	0.303 ± 0.008 ^{b,c}
F值		67.487	10.694	130.009	59.643
P值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a: 与对照组比较,P<0.01; b: 与IL-1β组比较,P<0.01; c: 与0.04 μg/mL LNT组比较,P<0.01; d: 与0.4 μg/mL LNT组比较,P<0.01

3 讨论

支气管哮喘是多种细胞和细胞组分参与的气道

慢性炎症性疾病,以慢性气道炎症、气道高反应性和气道重塑为主要特征。气道重塑病理特点包括上皮细胞化生,新生血管形成,杯状细胞增生及黏液分泌,平滑肌细胞增殖及迁移,肌成纤维细胞增殖及细

胞外基质沉积等^[5-6]。Holgate 等^[7]提出在气道基底膜下存在一层纤维细胞层,该层细胞使上皮层、神经组织和细胞外基质保持紧密联系,并共同构成上皮-间充质营养单位(EMTU)。正常情况下,气道发育成熟后 EMTU 处于静止状态,但当环境中各种危险因素引起气道上皮损伤,损伤的上皮可产生转化生长因子- β (TGF- β)、成纤维细胞因子(FGF)等促纤维增殖因子,促进肺 FB 向肌成纤维细胞转化,活化的肌成纤维细胞继续分泌内皮素-1(ET1)、血管内皮生长因子、胶原蛋白等,产生气道慢性炎症和气道重塑^[8-9]。IL-1 是一种多功能细胞因子,在炎症反应的起始阶段居中心地位,能活化淋巴细胞,促进气道炎症区域炎症细胞的黏附与趋化,促进炎症介质的释放^[10]。Lappalainen 等^[11]发现 IL-1 β 促使小鼠肺部炎症,肺泡间弹力纤维断裂,气道壁纤维化,胸膜厚度增加。本课题组的前期研究发现,哮喘大鼠模型的血清及肺泡灌洗液中 IL-1 β 浓度增高,并可能部分通过激活 JNK 信号转导途径参与哮喘气道重塑过程^[12]。

肌成纤维细胞在超微结构和功能上兼有 FB 和平滑肌细胞两种特征,具有收缩性、合成过量细胞外基质、分泌炎症介质等作用,而 α -SMA 是 FB 向肌成纤维细胞转化的标志物^[13];Col I 是 FB 分泌的构成细胞外基质胶原之一;FN 可通过丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)或其他信号通路诱导炎症细胞生长、迁移、分化,并促进细胞外基质沉积,参与气道重塑^[14]。本研究发现 IL-1 β 在 0.1 ~ 10 ng/mL 范围内,可明显促进细胞增殖, α -SMA 蛋白, FN、Col I 和 α -SMA mRNA 的表达增加,且具有明显的浓度依赖性。提示 IL-1 β 可促进肺 FB 增殖并向肌成纤维细胞转化,并诱导 FN、Col I mRNA 表达上调分泌大量胶原和细胞外基质沉积,影响了气道重塑过程。

LNT 是从担子菌纲伞菌目伞菌科香菇菌中提取的一种葡聚糖,具有激活免疫调节、抑制肿瘤增殖迁移能力、调节人体脂肪及糖类代谢等作用^[3]。Kirmaz 等^[15]发现过敏性鼻炎的患者使用 LNT 后,鼻腔灌洗液中 IL-4 与 IL-5 水平下降,IL-12 升高,提示 LNT 可通过调节 Th1/Th2 平衡提高机体免疫功能。在哮喘大鼠模型的研究中也有类似报道^[4]。本研究发现,LNT 可抑制 IL-1 β 诱导的细胞的增殖及 α -SMA 蛋白和 FN、Col I、 α -SMA mRNA 的表达,

提示 LNT 可抑制肺 FB 增殖、表型转化及细胞外基质积聚及哮喘气道重塑的发生,可能为哮喘的治疗提供了新的途径。

[参 考 文 献]

[1] Davies DE. The role of epithelium in airway remodeling in asthma [J]. Proc Am Thorac Soc, 2009, 6(8): 678-682.

[2] Holgate ST, Arshad HS, Roberts GC, Howarth PH, Thurner P, Davies DE. A new look at the pathogenesis of asthma [J]. Clin Sci (Lond), 2009, 118(7):439-450.

[3] Rop O, Mleek J, Jurikova T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects [J]. Nutr Rev, 2009, 67(11):624-631.

[4] 王蕾, 曹高忠, 叶乐平, 方丽. 香菇多糖对哮喘大鼠模型气管炎症反应及辅助性 T 淋巴细胞 1/辅助性淋巴细胞 2 免疫应答失衡的调节 [J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(21):1630-1631.

[5] Tang ML, Wilson JW, Stewart AG, Royce SG. Airway remodell in asthma: current understanding and implications for future therapies [J]. Pharmacol Ther, 2006, 112(2):474-488.

[6] Bergeron C, Oulet LP. Structural changes in airway diseases characteristics, echanisms, onsequences, and pharmacologic modulation [J]. Chest, 129(4):1068-1087.

[7] Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, Wilson SJ, Puddicombe SM, Lordan JL. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 105(2 pt 1): 193-204.

[8] Knight DA, Lane CL, Stick SM. Does aberrant activation of the epithelial-mesenchymal trophic unit play a key role in asthma or is it an unimportant sideshow? [J]. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4(3): 251-256.

[9] Holgate ST, Holloway J, Wilson S, Howarth PH, Haitchi HM, Babu S, et al. Understanding the pathophysiology of severe asthma to generate new therapeutic opportunities [J]. J Allergy Clin Immunol, 2006, 117(3): 496-506.

[10] Dinarello CA. Proinflammatory cytokines [J]. Chest, 2000, 188(2): 503-508.

[11] Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE, Tichelaar JW, Bry K. Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 32(4):311-318.

[12] 林立, 李昌崇, 管小俊, 王晓丽, 王强, 张维溪, 等. 哮喘气道重塑大鼠肺组织磷酸化 JNK、血清/BALF 白介素 1 β 表达变化 [J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(10):952-955.

[13] Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts [J]. Proc Am Thorac Soc, 2008, 5(3): 334-337.

[14] 苏苗赏, 李昌崇. 纤维链接蛋白与支气管哮喘气道重构 [J]. 国外医学:呼吸杂志分册, 2005, 25(9):682-684.

[15] Kirmaz C, Bayrak P, Yilmaz O, Yuksel H. Effects of glucan treatment on the Th1/Th2 balance in patients with allergic rhinitis a double-blind placebo-controlled study [J]. Eur Cytokine Netw, 2005, 16(2): 128-134.

(本文编辑:王庆红)