

不同浓度脂多糖诱导人支气管上皮细胞 β 防御素 3 的表达

李嘉, 张兵, 钟礼立

(湖南省人民医院儿科, 湖南 长沙 410005)

[摘要] **目的** 观察不同浓度脂多糖(LPS)诱导人支气管上皮细胞 β 防御素 3(hBD-3)的表达,探讨 hBD-3 在呼吸道感染中的作用。**方法** 用不同浓度的 LPS(0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$)诱导人支气管上皮细胞后,2 h 行 RT-PCR 法检测 hBD-3 mRNA 的表达,4 h 行 Western blot 检测 hBD-3 蛋白的表达。**结果** 正常人支气管上皮细胞有微量 hBD-3 表达,LPS 诱导细胞后,hBD-3 mRNA 及蛋白表达均增加,与对照组相比差异有非常显著性($P < 0.01$);不同浓度 LPS 诱导细胞后,随着 LPS 浓度的增加 hBD-3 mRNA 和蛋白的表达亦随之增加,不同浓度组间比较差异有显著性($P < 0.05$)。**结论** 一定剂量的 LPS 可诱导人支气管上皮细胞 hBD-3 表达,且呈浓度依赖性,推测 hBD-3 可能参与呼吸道对 LPS 最初的防御反应。[中国当代儿科杂志,2009,11(7):577-580]

[关键词] β 防御素-3;脂多糖;人支气管上皮细胞
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)07-0577-04

Expression of human β -defensin-3 induced by lipopolysaccharide in human bronchial epithelial cells

LI Jia, ZHANG Bing, ZHONG Li-Li. Department of Pediatrics, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, China (Zhang B, Email: zhangbing1959415@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the expression of human β -defensin-3 (hBD-3) induced by lipopolysaccharide (LPS) in human bronchial epithelial (HBE) cells, and explore the role of hBD-3 in respiratory infection. **Methods** HBE cells were stimulated with different concentrations of LPS (0.01, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/mL}$). hBD-3 mRNA expression was detected by RT-PCR 2 hrs later. hBD-3 protein expression was detected by Western blot 4 hrs later. **Results** hBD-3 mRNA and protein was weakly expressed in normal HBE cells. LPS stimulation resulted in a significant increase of hBD-3 mRNA and protein expression ($P < 0.01$). hBD-3 mRNA and protein expression increased with increasing LPS concentrations. There were significant differences in the hBD-3 mRNA and protein expression in cells stimulated by different concentrations of LPS ($P < 0.05$). **Conclusions** LPS can induce hBD-3 expression in a dose-dependent manner. hBD-3 might play a role in initial defensive reaction against bacterial invasion.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (7):577-580]

Key words: β -defensin-3; Lipopolysaccharide; Human bronchial epithelial cell

下呼吸道感染是儿童最常见的疾病,也是 5 岁以下儿童最常见的死亡原因之一。近年来,由于细菌耐药菌株的不断增加,致使抗生素在临床中的应用面临巨大压力。因此,促使人们不断寻找新型抗生素以及其他不易产生耐药性的抗菌物质。防御素(defensin)即是近年研究发现的具有抗菌能力的物质,它是一种具有广泛的杀菌活性、细胞毒性和免疫趋化作用的阳离子多肽,对革兰阳性、阴性细菌,真菌以及包膜病毒都能产生较强的杀伤作用^[1]。相对于抗生素它具有不易产生耐药性的特点^[2]。人防御素分为 α 、 β 、 θ 三种。人 β 防御素 3(human β -defensin-3, hBD-3) 是 Harder 等^[3] 于 2000 年从银

屑病患者皮损组织中发现的,可被细菌、炎症介质等外界刺激诱导。它主要在皮肤和扁桃体中有较强的表达,在呼吸道也有一定量的表达^[4]。与 hBD-1 和 hBD-2 相比,hBD-3 的抗菌谱更广,并具有特殊的分子结构及属于非盐离子浓度敏感型^[5-7]。因此,hBD-3 具有更大的研究价值及应用前景。但目前对 hBD-3 在感染后呼吸道上皮细胞中表达的研究较少。本研究利用革兰阴性菌胞膜外层的主要成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)对人支气管上皮细胞造成损伤,采用 RT-PCR 和 Western blot 法检测 hBD-3 mRNA 及蛋白在正常和损伤细胞中表达水平的变化,为以后人工调控其分泌、防治呼吸道感染进

[收稿日期]2008-11-25;[修回日期]2008-12-30
[作者简介]李嘉,女,硕士研究生,医师。主攻方向:小儿感染性疾病。
[通讯作者]张兵,男,主任医师,湖南省人民医院儿科,邮编:410005。

行前期研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人支气管上皮细胞(购自中南大学湘雅医学院湘雅细胞中心)。

1.1.2 主要试剂 新生牛血清(FCS)(杭州四季青公司), 1640(美国 GIBCO 公司), LPS(E. coli L2880)及琼脂糖(Sigma 公司), Trizol(Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒(Fermentas 公司), TAG 酶及 dNTP(Tiagen 公司), 二乙基焦碳酸酯(DEPC,北京鼎国生物技术公司), hBD-3 引物及阳性对照 β -actin 引物(上海英骏生物工程技术有限公司合成), 兔抗人 hBD-3 抗体(Absun 公司), 辣根酶标记山羊抗兔 IgG(北京中杉公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 将生长良好的支气管上皮细胞随机分为 5 组(每组 16 瓶): 对照组(加入含 10% FCS 的 1640 培养基 5 mL); LPS 组(又分为 4 个小组, 分别加入含 LPS 浓度为 0.01, 0.1, 1, 10 μ g/mL 的 10% FCS 的 1640 培养基 5 mL)。各组均置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中, 培养 2 h 后随机收集 8 瓶细胞, 然后提取细胞总 RNA, 余下 8 瓶支气管上皮细胞培养 4 h 后收集细胞提取胞浆蛋白。

1.2.2 半定量 RT-PCR 检测 hBD-3 mRNA 的表达 取不同实验组的支气管上皮细胞, 采用 Trizol 法抽提 RNA。依吸光度值, 取等量总 RNA 进行逆转录, 含 1 μ L 随机引物, 2 μ L dNTP, 1 μ L MMLV, 总体积 20 μ L。反应条件为: 70℃ 5 min, 37℃ 5 min, 42℃ 60 min, 70℃ 10 min。以逆转录产物为模板, 采用 Tag 酶, 按以下程序进行 PCR 反应。上游引物为: 5'-AGCCTAGCAGCTATGAGGATC-3', 下游引物为: 5'-CTTCGGCAGCATTTTCGGCCA-3', 产物长 206 bp。反应条件为: 98℃ 预变性 5 min, 再经 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 32 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min。产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳。同时设阳性对照 β -actin, 产物长 450 bp。

1.2.3 Western blot 检测胞浆 hBD-3 蛋白的表达 取不同浓度 LPS 诱导培养 4 h 后的支气管上皮细胞, 加入适量 RIPA 裂解液, 冰上孵育 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为胞浆蛋白。将胞浆蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后电转移至 PVDF 膜上。把膜放入含 5 g 脱脂奶粉的 TBST(10 mmol/L Tris pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 0.1% Tween20)中室

温封闭 1 h, 加入兔抗人 hBD-3 和 β -actin 多克隆抗体(hBD-3 以 1:200 稀释, β -actin 以 1:500 稀释)4℃ 摇动过夜。次日用 TBST 于室温下洗膜 4 次, 每次 10 min, 接着加入辣根酶标记山羊抗兔 IgG 抗体(1:2 000 稀释), 在室温下轻轻摇动 1 h, 然后用 TBST 室温下洗膜 3 次。最后用化学发光法曝光显迹, 按化学发光显影试剂盒(ECL)说明要求加入 ECL 试剂, 室温下温育 3 min 后对 X 线片曝光。

1.3 统计学分析方法

所有数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用 SPSS 13.0 软件进行方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 hBD-3 mRNA 的表达

通过 RT-PCR 检测发现, 正常人支气管上皮细胞中 hBD-3 mRNA 有微量表达, LPS 诱导支气管上皮细胞后, hBD-3 mRNA 表达增加, 与对照组相比差异有非常显著性($P < 0.01$); 用不同浓度的 LPS(0.01, 0.1, 1, 10 μ g/mL)诱导细胞 2 h 后, hBD-3 mRNA 表达亦随之增多, 且在上述 LPS 浓度范围内呈剂量依赖性, 不同浓度组间比较差异有显著性($P < 0.05$)。hBD-3 mRNA 表达的半定量结果以 hBD-3/ β -actin 吸光度的相对值计算, 结果见表 1 和图 1, 2。

表 1 不同浓度的 LPS 诱导支气管上皮细胞 hBD-3 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	实验次数	hBD-3mRNA 表达 (hBD-3/ β -actin 吸光度比值)
对照组	8	0.13 $\pm$ 0.003
LPS 组		
0.01 μ g/mL 组	8	0.16 $\pm$ 0.007 ^a
0.1 μ g/mL 组	8	0.20 $\pm$ 0.003 ^{a,b}
1 μ g/mL 组	8	0.24 $\pm$ 0.008 ^{a,b}
10 μ g/mL 组	8	0.31 $\pm$ 0.010 ^{a,b}

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与上一组比较, $P < 0.05$ 。

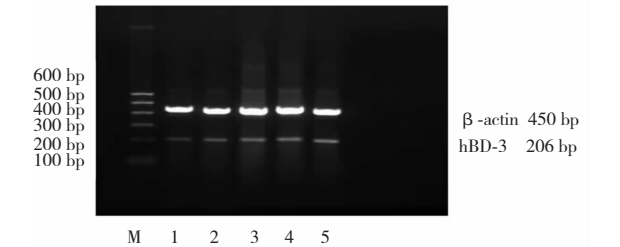


图 1 hBD-3mRNA 的表达 M: Marker; 1: 对照组; 2: 0.01 μ g/mL LPS 组; 3: 0.1 μ g/mL LPS; 4: 1 μ g/mL LPS 组; 5: 10 μ g/mL LPS 组。

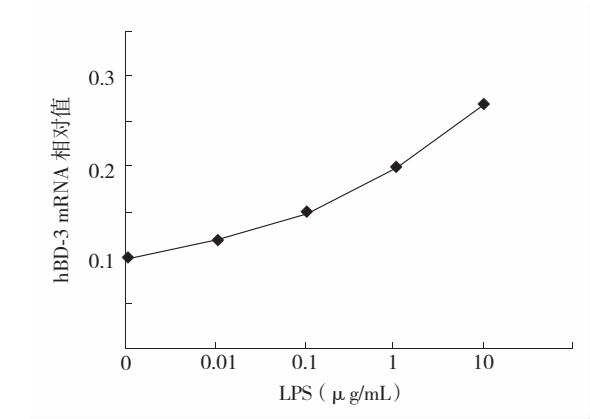


图 2 LPS 浓度与 hBD-3 mRNA 表达量效关系

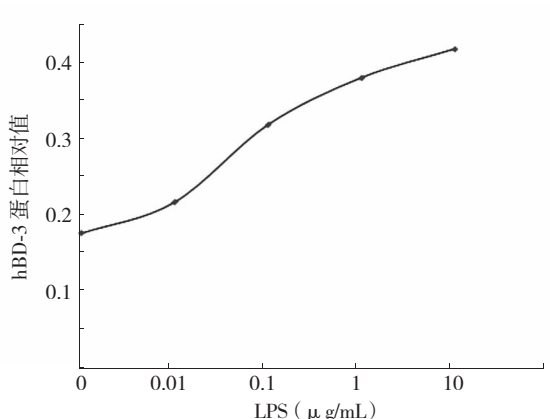


图 4 LPS 浓度与 hBD-3 蛋白表达量效关系

2.2 hBD-3 蛋白表达

用 LPS 诱导支气管上皮细胞 4 h 后提取胞浆蛋白,行 SDS-PAGE 凝胶电泳发现,正常人支气管上皮细胞中 hBD-3 蛋白有微量表达,LPS 可诱导人支气管上皮细胞 hBD-3 蛋白表达,与对照组相比差异有非常显著性($P<0.01$);随着 LPS 浓度增加 hBD-3 蛋白表达量也增加,在 0.01 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈剂量依赖关系,不同浓度组间比较有显著性差异($P<0.01$)。hBD-3 蛋白表达的半定量结果以 hBD-3/ β -actin 吸光度的相对值计算,结果见表 2 和图 3,4。

表 2 不同浓度的 LPS 诱导支气管上皮细胞 hBD-3 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	实验次数	hBD-3 mRNA 表达 (hBD-3/ β -actin 吸光度比值)
对照组	8	0.181 $\pm$ 0.021
LPS 组		
0.01 $\mu\text{g/mL}$ 组	8	0.225 $\pm$ 0.020 ^a
0.1 $\mu\text{g/mL}$ 组	8	0.319 $\pm$ 0.010 ^{a,b}
1 $\mu\text{g/mL}$ 组	8	0.376 $\pm$ 0.010 ^{a,b}
10 $\mu\text{g/mL}$ 组	8	0.421 $\pm$ 0.012 ^{a,b}

a: 与对照组比较, $P<0.01$; b: 与上一组比较, $P<0.01$

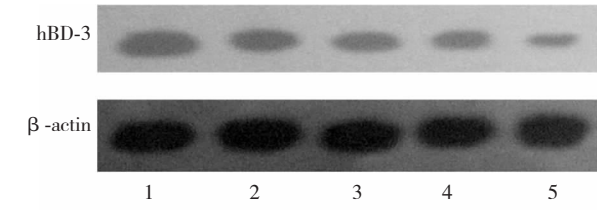


图 3 Western blot 法检测 hBD-3 蛋白表达的结果
1: 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组; 2: 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组; 3: 0.1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组;
4: 0.01 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组; 5: 对照组

3 讨论

hBD-3 具有强力、广谱的抗微生物活性,近年来已成为国内外众多研究者关注的热点。近来研究发现,hBD-3 在多种感染部位表达水平显著升高,如烧伤皮肤感染区^[8]、关节炎^[9]、口腔上皮^[10]等,而对下呼吸道感染的研究较少。Harder 等^[3]利用铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌及肿瘤坏死因子(TNF- α)等诱导气道上皮细胞和 A549 肺泡上皮细胞引起损伤,发现 hBD-3 在损伤的细胞中表达增强。Ishimoto 等^[7]亦发现,在金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌等细菌性肺炎急性期,hBD-3 表达强度增加,治疗后其表达强度降低。但这些研究多以单一菌种刺激呼吸道上皮细胞观察 hBD-3 表达的变化,且缺乏 hBD-3 表达量与诱导物剂量之间关系的研究。

LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要成分,当细菌死亡或解体时即释放出内毒素,并随血液循环进入全身各个系统,引起全身炎症反应^[11~13]。内毒素致急性肺损伤是临床常见危重症,也是实验研究呼吸系统炎症反应的常用模型。本研究以多种革兰阴性菌死亡后释放的产物 LPS 为诱导物,诱导人支气管上皮细胞 hBD-3 mRNA 和蛋白的表达,观察不同浓度 LPS 诱导后 hBD-3 表达量的变化,为探索 hBD-3 能否成为可调控、诱导的体内抗菌物质的研究打下基础。

本研究发现,正常人支气管上皮细胞中 hBD-3 mRNA 及蛋白有微量表达,用 LPS 诱导培养的支气管上皮细胞,2 h 后即可使 hBD-3 mRNA 的表达明显增多,4 h 后即出现 hBD-3 蛋白的表达;用不同浓度的 LPS 诱导后,hBD-3 mRNA 和蛋白表达亦随之增多,并与一定剂量范围内的 LPS 呈剂量依赖性。

推测当病原微生物侵袭呼吸道时,hBD-3 在短时间内即可表达,参与呼吸道最初的防御反应,并随着感染的加重 hBD-3 表达亦随之增加,推测 hBD-3 可能在机体免疫防御反应中起着重要作用。随着研究的不断深入,有望能通过人工调控的方式诱导呼吸道内源性 hBD-3 的表达。但感染后机体具体通过何种机制促进 hBD-3 的表达,以及 hBD-3 表达过多对机体是否有害,目前尚不十分清楚,有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Schroder JM. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements[J]. Cell Mol Life Sci, 1999, 56(1-2): 32-46.

[2] Schröder JM, Harder J. Human beta-defensin-2[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1999, 31(6):645-651.

[3] Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic[J]. J Biol Chem, 2001, 276(8): 5707-5713.

[4] Jia HP, Schutte BC, Schudy A, Linzmeier R, Guthmiller JM, Johnson GK, et al. Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach[J]. Gene, 2001, 263(1-2): 211-218.

[5] Sahly H, Schubert S, Harder J, Rautenberg P, Ullmann U, Schroder J, et al. Burkholderia is highly resistant to human beta-defensin 3[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(5): 1739-1741.

[6] Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB Jr, et al. The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against Staphylococcus aureus[J]. J Biol Chem, 2002, 277(10): 8279-8289.

[7] Ishimoto H, Mukae H, Date Y, Shimbara T, Mondal MS, Ashitani J, et al. Identification of hBD-3 in respiratory tract and serum: the increase in pneumonia[J]. Eur Respir, 2006, 27(2): 253-260.

[8] 庾晓晔, 柴家科,冯瑞,盛志勇. 人 β -防御素 3 在感染皮肤组织中表达的研究[J]. 军事医学科学院院刊, 2007, 31(1): 36-38.

[9] Varoga D, Pufe T, Harder J, Schroder JM, Mentlein R, Meyer-Hoffert U, et al. Human β -defensin-3 mediates tissue remodeling processes in articular cartilage by increasing levels of metalloproteinases and reducing levels of their endogenous inhibitors[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(6): 1736-1745.

[10] Feng Z, Jiang B, Chandra J, Ghannoum M, Nelson S, Weinberg A. Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by Candida albicans[J]. Dent Res, 2005, 84(5):445-450.

[11] 刘锦铭,许德凤,李秀忠,张红,周玮,吴振裘. 内毒素诱导的动物 ARDS 肺内分流气体交换及呼吸力学研究[J]. 中国当代儿科杂志,2001,3(1):35-38.

[12] 蔡栩栩,吴文斌,杜悦,刘春峰,张红,卢岩. TNF- α 和 IkB α 在内毒素致新生大鼠肺出血中的作用研究[J]. 中国当代儿科杂志,2003,5(4):301-305.

[13] 刘春英,王丽杰,王艳斌,吕庆杰,姜卫国,孙梅. 内毒素血症幼年大鼠胃黏膜 pS₂ TGF- α 和 PCNA 表达变化及意义[J]. 中国当代儿科杂志,2008,10(2):221-224.

(本文编辑:徐福兰)