

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.29.013

脂多糖对气道上皮细胞分泌炎症因子的影响*

舒 艳, 蔡 颖[△], 况九龙[▲]

(南昌大学第二附属医院呼吸内科, 南昌 330006)

[摘要] **目的** 检测不同浓度脂多糖(LPS)刺激气道上皮细胞不同时间后炎症因子[转化生长因子(TGF)- β 、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、细胞间黏附分子(ICAM)-1、ICAM-2]分泌量的变化,从而探索 LPS 在调节气道上皮细胞炎症因子分泌中的作用。**方法** 用培养贴壁细胞的方法,培养具有气道上皮细胞特性的 A549 细胞株,用不同浓度的 LPS(0、0.1、1.0、10.0、20.0、30.0、50.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激饥饿 24 h 后的同等数量的 A549 细胞,分别在刺激 2、4、8、24、30 h 以后收集细胞上清液;用 ELISA 方法检测 A549 细胞各炎症因子分泌量,分析不同时间点的变化。**结果** (1)LPS 能够干预气道上皮细胞分泌 TGF- β 、MCP-1、TNF- α 、ICAM-1 和 ICAM-2;当 LPS 干预浓度为 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,干预时间为 4 h 和 8 h 时,ICAM-1 的分泌量达到峰值;当 LPS 干预浓度为 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,干预时间为 4 h 时,MCP-1 的分泌量达到峰值。(2)TGF- β 、MCP-1、TNF- α 、ICAM-1 和 ICAM-2 的分泌量与 LPS 的干预浓度和干预时间有一定关系,在各个时相点,TNF- α 、MCP-1 和 ICAM-1 分泌量达到最大时空白对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$);在干预时间为 30 h 时,TGF- β 分泌量下降,ICAM-2 的分泌量与空白对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);在其余各时相点,TGF- β 和 ICAM-2 分泌量最大时也需要一个最佳的 LPS 干预浓度,且与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** LPS 对气道上皮细胞 TGF- β 、MCP-1、TNF- α 、ICAM-1 和 ICAM-2 分泌量的影响与 LPS 的干预浓度和干预时间相关,特定的干预浓度和干预时间可使相应的炎症因子分泌达峰值。

[关键词] 脂多糖类;A549 细胞;炎症因子

[中图分类号] R562

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)29-4066-04

The inflation of lipopolysaccharide to cytokine in airway epithelial cell*

Shu Yan, Cai Ying[△], Kuang Jiulong[▲]

(Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To detect different cytokines (TGF- β , MCP-1, TNF- α , ICAM-1, ICAM-2) concentration after lipopolysaccharides(LPS) stimulation airway epithelial cells at the same time, to explore the role of LPS in the airway epithelial cells secreting a variety of cytokines. **Methods** A549 cell strain was cultivated and interfered by different concentrations LPS(0, 0.1, 1.0, 10.0, 20.0, 30.0, 50.0, 100) $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 2, 4, 8, 24, 30 h. Collected culture medium and total protein in the cell, detected volume of cytokines TGF- β , MCP-1, TNF- α , ICAM-1 and ICAM-2 secreted by A549 cell using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), to analysed the changes of above-mentioned cytokines at the different time period. **Results** First, LPS interfered the airway epithelial cells secreting TGF- β , MCP-1, TNF- α , ICAM-1 and ICAM-2; the secretion of ICAM-1 peaked when the concentration of LPS was 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the time was 4 h and 8 h; the secretion of MCP-1 peaked when the concentration of LPS was 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the time was 4 h. Second, the volume of cytokines TGF- β , MCP-1, TNF- α , ICAM-1, ICAM-2 was related to the concentration and the period of LPS. Compared with the control group, the maximum secretion of TNF- α , MCP-1 and ICAM-1 were increased at all the different time, the difference was statistically significant ($P < 0.01$); whereas at the 30 h, the secretion of TGF- β was decreased and the secretion of ICAM-2 was not different from the control group ($P > 0.05$), compared with the control group, the maximum secretion of TGF- β and ICAM-2 were increased at all the other different time, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** LPS influenced the volume of cytokines TGF- β , MCP-1, TNF- α , ICAM-1 and ICAM-2 are related to the time and concentration of LPS, the particular intervention time and concentration enabled them reaches maximum.

[Key words] lipopolysaccharides; A549 cell; cytokines

气道上皮细胞具有活跃的分泌功能,在外界因素的干预作用下,可以释放多种炎症因子,包括趋化因子如单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1 MCP-1),生长因子如人粒巨噬细胞集落刺激因子(human granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF),转化生长因子(transforming growth factor, TGF),其他因子如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),细胞间黏附分子(human intercellu-

lar adhesion molecule, ICAM),血管细胞黏附分子等^[1-5]。脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)作为革兰阴性细菌细胞壁成分在人类工作或生活中无处不在,是一种具有强烈免疫调节作用的物质,能够诱导抗原提呈细胞产生 IL-12 和 IFN- γ ,促进 TH1 型反应而抑制 TH2 型反应^[6],LPS 还可以诱导 CD14 和 TLR4 信号通路激活固有免疫系统,从而活化转录因子 NF- κB 诱发炎症反应^[7]。LPS 是否通过影响气道上皮细胞 MCP-1、TGF-

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81060011/H0118)。 作者简介:舒艳(1983-),硕士,主要从事呼吸病学研究。 [△] 通讯作者: E-mail: caiying5540@sina.com。 [▲] 通讯作者: E-mail: kuangjl2004@yahoo.com.cn。

β 、TNF- α 、ICAM-1 和 ICAM-2 的分泌,从而参与气道的炎症反应,目前国内外文献尚缺乏相关报道。本实验通过采用不同浓度 LPS 干预气道上皮细胞不同时间后检测 A549 细胞 MCP-1、TGF- β 、TNF- α 、ICAM-1 和 ICAM-2 的分泌量的变化,从而为阐述气道炎症反应机制提供更多的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 高糖双抗 DMEM 培养基、胰蛋白酶、LPS、冻存液,均购于北京 Solarbio 科技有限公司;胎牛血清,浙江天航生物科技有限公司;ELISA 试剂盒,上海森熊科技实业有限公司。细胞培养基[取含高糖双抗(抗青霉素及链霉素)的 DMEM 培养基 90 mL,并加入胎牛血清 10 mL 配成 100 mL 的培养基];胰酶(准确称取胰酶 0.25 g,并将其溶于 100 mL PBS 溶液中);LPS(将购买的来源于大肠杆菌 O55:B5 菌株的脂多糖 10 mg 用 PBS 稀释配置成浓度为 1 mg/mL 并分装至 EP 管内放置于 -20 °C 冰箱内保存,待使用时解冻并用血清配置成干预浓度)。

1.2 方法 分别采用煮沸、涮洗、泡酸等物理和化学方法消毒实验玻璃器械。在紫外灯消毒超净工作台内进行细胞换液、传代、细胞冻存、细胞复苏及 LPS 干预(使脂多糖的终浓度为 0、0.1、1.0、10.0、20.0、30.0、50.0 μ g/mL 和 100 μ g/mL,干预时间分别为 2、4、8、24、30 h)。直接收集药物干预后的细胞上清液,备用于 ELISA 检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各个时相点不同浓度 LPS 干预 A549 细胞后各因子分泌量的均数变化趋势图 在 LPS 干预浓度为 20.0 μ g/mL,干预时间为 4 h 和 8 h 时,ICAM-1 的分泌量达到峰值,见图 1;LPS 干预浓度为 50.0 μ g/mL,干预时间为 4 h 时,MCP-1 的分泌量达到峰值,见图 2;在其他时间点及 LPS 干预浓度,各类炎症因子分泌量变化趋势不明显,见图 3~5。

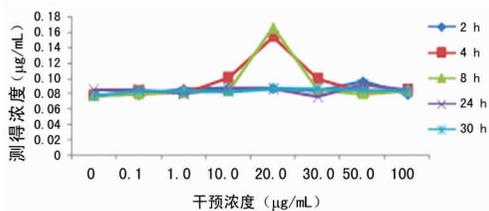


图 1 ICAM-1 平均数变化趋势图

2.2 各个时相点不同浓度 LPS 干预 A549 细胞后各因子分泌量方差分析的结果 不同浓度 LPS 在各个时相点干预 A549 细胞后其差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), LPS 能够干预

TGF- β 、TNF- α 、MCP-1、ICAM-1、ICAM-2 的分泌,见表 1。

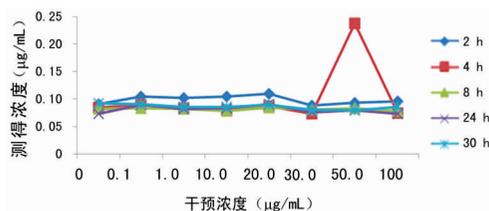


图 2 MCP-1 平均数变化趋势图

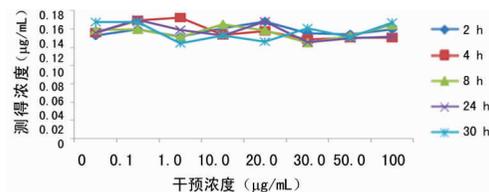


图 3 ICAM-2 平均数变化趋势图

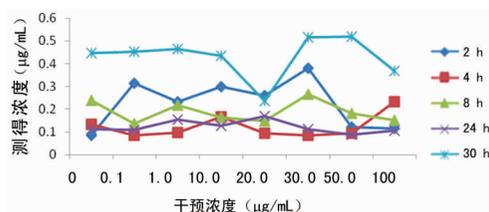


图 4 TGF- β 平均数变化趋势图

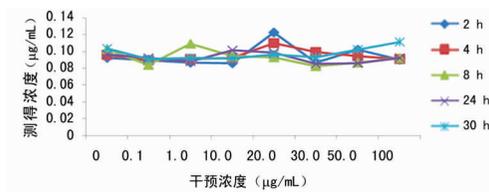


图 5 TNF- α 平均数变化趋势图

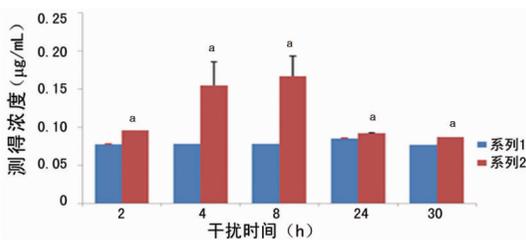
2.3 各个时相点各因子分泌量达到最大(小)时与空白对照组比较的直方图 在干预时间为 30 h 时,ICAM-2 分泌量最大时与空白对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);在其余各时相点,ICAM-2 分泌量最大时与空白对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);在干预时间为 30 h 时,TGF- β 有一个分泌量最小时的 LPS 干预浓度,且其与空白对照组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);在其余各时相点,TGF- β 分泌量最大时与空白对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);在各个时相点,TNF- α 、MCP-1、ICAM-1 均存在一个分泌量达到最大时的 LPS 干预浓度,与空白对照组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 6~10。

表 1 各个时相点不同浓度 LPS 干预 A549 细胞后炎症因子变化的结果 ($\bar{x} \pm s$)

项目	2 h	4 h	8 h	24 h	30 h
ICAM-1	0.085 0 \pm 0.006 0	0.096 0 \pm 0.027 4	0.092 0 \pm 0.029 9	0.085 0 \pm 0.004 4	0.084 0 \pm 0.003 1
F	1 081.122	15.393	52.409	451.308	94.776
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
ICAM-2	0.118 0 \pm 0.005 3	0.117 0 \pm 0.008 5	0.117 0 \pm 0.006 5	0.117 0 \pm 0.008 2	0.117 0 \pm 0.009 3
F	71.326	256.959	332.867	994.857	474.568
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MCP-1	0.226 0 \pm 0.101 7	0.124 0 \pm 0.050 0	0.188 0 \pm 0.045 3	0.122 0 \pm 0.026 0	0.430 0 \pm 0.087 6

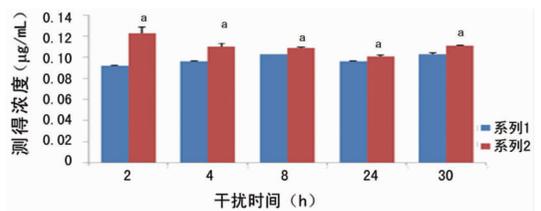
续表 1 各个时相点不同浓度 LPS 干预 A549 细胞后炎症因子变化的结果($\bar{x} \pm s$)

项目	2 h	4 h	8 h	24 h	30 h
F	47 488.271	11 607.497	8 229.743	3 765.014	645.070
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
TGF- β	0.098 0 \pm 0.007 4	0.101 0 \pm 0.055 2	0.082 0 \pm 0.002 3	0.081 0 \pm 0.006 1	0.086 0 \pm 0.004 3
F	897.693	42.166	59.714	116.237	238.924
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
TNF- α	0.095 0 \pm 0.012 0	0.095 0 \pm 0.006 5	0.093 0 \pm 0.008 8	0.093 0 \pm 0.005 6	0.098 0 \pm 0.006 9
F	167.594	67.844	1 273.894	255.865	773.153
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

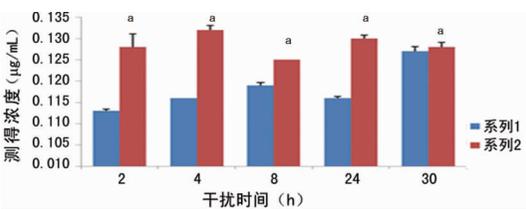


系列 1: LPS 刺激浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$; 系列 2: 从左至右分别代表 LPS 刺激浓度为 50.0、20.0、20.0、50.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$; $^a: P < 0.01$ 。

图 6 ICAM-1 分泌量最大时与空白对照组比较的直方图

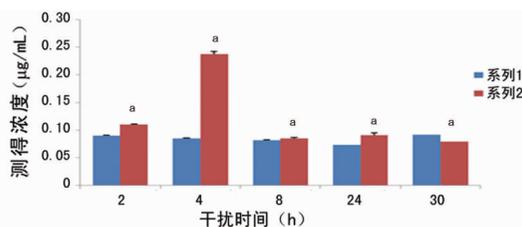


系列 1: LPS 浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$; 系列 2: 从左至右代表的 LPS 浓度分别为 20.0、20.0、1.0、10.0、100 $\mu\text{g/mL}$; $^a: P < 0.01$ 。

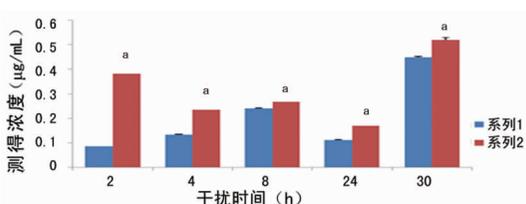
图 10 TNF- α 分泌量最大时与空白对照组比较的直方图

系列 1: LPS 浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$; 系列 2: 从左至右代表的 LPS 浓度分别为 20.0、1.0、10.0、0.1、20.0 $\mu\text{g/mL}$; $^a: P < 0.01$ 。

图 7 ICAM-W 分泌量最大时与空白对照组比较的直方图



系列 1: LPS 浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$; 系列 2: 从左至右代表的 LPS 浓度分别为 20.0、50.0、20.0、20.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$; $^a: P < 0.01$ 。

图 8 TGF- β 分泌量最大(小)时与空白对照组比较的直方图

系列 1: LPS 浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$; 系列 2: 从左至右代表的 LPS 浓度分别为 30.0、100.0、30.0、20.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$; $^a: P < 0.01$ 。

图 9 MCP-1 分泌量最大时与空白对照组比较的直方图

3 讨 论

本实验主要是研究不同时相点不同浓度 LPS 对气道上皮细胞分泌 MCP-1、TGF- β 、TNF- α 、ICAM-1 和 ICAM-2 的影响, 分析炎症因子分泌量的变化, 从而为探索气道炎症机制提供理论基础。

研究表明 LPS 可以通过 TNF- α 、IL-1 β 、诱生型一氧化氮合酶等影响巨噬细胞功能^[8], 而 Muller-Decker 等^[9]在用 LPS 刺激小鼠舌源性上皮细胞系的实验中发现 LPS 并没有通过内源性炎症因子如 TNF- α 、TGF- β 等影响上皮细胞功能, 而本研究却发现 LPS 可以干预气道上皮细胞对炎症因子 MCP-1、TGF- β 、TNF- α 、ICAM-1 和 ICAM-2 的分泌。对气道上皮细胞的研究中发现 LPS 能够干预气道上皮细胞分泌 MCP-1, 在 LPS 干预浓度为 50.0 $\mu\text{g/mL}$, 干预时间为 4 h 时, MCP-1 的分泌量达到一个峰值, 与上述结果相似; 而且在各个时相点, 都存在一个最佳的 LPS 干预浓度使 MCP-1 的分泌量达到最大, 这就说明 MCP-1 可能在气道上皮细胞发生炎症的过程中起着重要作用。用 LPS 作为刺激因素建造的人体或是动物呼吸系统损伤模型都是以支气管肺泡内中性粒细胞灌注和炎症因子分泌增多为特征的, 而且这个特征已经被用于检测新的抗炎药物^[10]; 激活的巨噬细胞和上皮细胞能够产生炎症因子如 TNF- α 和 IL-1 β , 这些炎症介质又可以诱导包括 IL-6 在内的其他炎症因子的释放^[11]; 本研究也发现 LPS 能够干预气道上皮细胞 TNF- α 的分泌, 且 TNF- α 的分泌量与 LPS 的干预浓度有关, 在各个时相点, 都存在一个最佳的 LPS 干预浓度, 与上述结果基本一致。牟海波等^[12]研究发现在树突状细胞的培养体系中加入 TGF- β 能够培养出更为幼稚的树突状细胞, 且此种细胞对 LPS 的刺激呈现一种低反应性; 近年来也有研究发现 LPS 可以通过 LPS 结合蛋白促进细胞释放炎症因子 TGF- β 和 IFN- γ ^[13]; 本研究结果跟上述结果基本一致, 本研究也发现 LPS 能够干预气道上皮细胞分泌 TGF- β ; 万力等^[14]研究发现一定浓度(0.005~0.100 $\mu\text{g/mL}$) LPS 干预并传代后成纤维

细胞 TGF- β 分泌量增加的同时, IFN- γ 分泌量降低, 且呈量效依赖关系, 随着 LPS 干预浓度的增加(0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 上述干预作用开始下降, 当刺激浓度达到 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 则呈相反作用, 也就是说 TGF- β 分泌量下降而 IFN- γ 分泌量开始升高; 本研究也发现 TGF- β 的分泌量跟 LPS 的干预浓度有关, 而且跟 LPS 的干预时间也有关系, 干预时间为 24 h 内(包括 24 h)时, TGF- β 的分泌量达到最大有一个最佳的 LPS 干预浓度, 而在干预时间为 30 h 时, TGF- β 的分泌量反而出现下降趋势; 而且还有人认为 TGF- β 缺乏的小鼠在生存的 3 周内就会发生全身炎症反应, 而且这种炎症反应和小肠上皮细胞功能紊乱有关^[15]; 目前, 多数学者认为, 肝脏的缺血再灌注损伤的核心仍然是炎症反应, 主要由炎症细胞介导。ICAM-1 通过与其配体 LFA-1 结合, 启动细胞黏附和活化, 使中性粒细胞牢固地黏附于血管壁; 还有研究显示 ICAM-1 可以介导中性粒细胞通过内皮细胞全层, 迁移至肝实质细胞, 释放蛋白酶和反应性氧原子, 造成肝细胞损伤^[16]; 而在气道上皮细胞中对 ICAM 炎症因子家族的研究相对较少, 而本研究对 ICAM-1 和 ICAM-2 同时做了研究, 发现 LPS 能够干预气道上皮细胞分泌 ICAM-1 和 ICAM-2, 在 LPS 干预浓度为 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 干预时间为 4, 8 h 时, ICAM-1 的分泌量可以达到峰值, 而且在各个时相点, ICAM-1 的分泌量均增加, 且存在一个最佳的 LPS 干预浓度; 而 ICAM-2 在除干预时间为 30 h 以外的各时相点才和 ICAM-1 分泌量的变化表现一致。

本研究通过不同浓度的 LPS 在不同时相点干预 A549 细胞, 并分析炎症因子 TGF- β 、TNF- α 、MCP-1、ICAM-1 和 ICAM-2 分泌量的变化, 发现 LPS 可以对气道上皮细胞 TGF- β 、MCP-1、TNF- α 、ICAM-1 和 ICAM-2 的分泌量产生影响, 而且上述炎症因子分泌量和 LPS 的干预浓度及干预时间有关, 这就说明气道炎症性疾病的发生与各种损伤性刺激的强度和um时间密切相关, 而且他还提示在疾病发生的合适时机对疾病进行干预可能会起到更好的治疗作用。

参考文献

- Peter RM, Robert JD, Jagdish LD. Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160(5):38-43.
- Hamel AL, Lin LL, Nayar GP. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs[J]. *J Virol*, 1998, 72: 5262-5267.
- Moustakas A, Pardali K, Gaal A, et al. Mechanisms of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation[J]. *Immunol Lett*, 2002, 82(1/2):85-91.
- 李玉梅, 卫红昌. ALI /ARDS 抗炎治疗研究的策略与展望[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(4):813-816, 825.
- 曾春芳, 吴亚梅. ICAM-1 在慢性阻塞性肺疾病大鼠气道炎症中的作用[J]. *泸州医学院学报*, 2004, 27(3):212-215.
- Liu AH. Something old, something new: indoor endotoxin, allergens and asthma[J]. *Paediatr Respir Rev*, 2004, 5 Suppl A:S65-71.
- Barnes PJ. Transcription factors in airway diseases[J]. *Lab Invest*, 2006, 86(9):867-872.
- Werling D, Hope JC, Howard CJ, et al. Differential production of cytokines reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists[J]. *Immunol*, 2004, 111:41-52.
- Muller-Decker K, Manegold G, Butz H, et al. Inhibition of cell proliferation by bacterial lipopolysaccharides in TLR4-positive epithelial cells: independence of nitric oxide and cytokine release[J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 124: 553-561.
- Tralau-Stewart CJ, Williamson RA, Nials AT, et al. GSK 256066, an exceptionally high-affinity and selective inhibitor of phosphodiesterase 4 suitable for administration by inhalation: in vitro, kinetic, and in vivo characterization[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 337(1):145-154.
- Barnes PJ. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD[J]. *COPD*, 2004, 1(1):59-70.
- 牟海波, 林茂芳, 岑洪, 等. 转化生长因子 $\beta 1$ 抑制树突状细胞的成熟及下调 TLR4 的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(8):1476-1479.
- Yun KJ, Koh DJ, Kim SH, et al. Anti-inflammatory effects of synaptic acid through the suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and proinflammatory cytokine expressions via nuclear factor kappaB inactivation[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(21):10265-10272.
- 万力, 李凤玉, 闫永宏, 等. 脂多糖对正常人皮肤成纤维细胞增殖及转化生长因子- $\beta 1$ 、 γ -干扰素分泌的诱导作用[J]. *华北国防医药*, 2009, 21(2):6-9.
- Ropeleski MJ, Tang J, Walsh-Reitz MM, et al. Interleukin-11-induced heat shock protein 25 confers intestinal epithelial-specific cytoprotection from oxidant stress[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124:1358-1368.
- 张宝良, 刘彤, 朱理玮, 等. 实验性大鼠原位肝移植供肝热缺血损伤研究[J]. *天津医科大学学报*, 2006, 12(1):8-10.
- (收稿日期:2015-04-17 修回日期:2015-05-21)
- orphan G-protein-coupled receptor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326(4):744-751.
- Rancoule C, Attané C, Grès S, et al. Lysophosphatidic acid impairs glucose homeostasis and inhibits insulin secretion in high-fat diet obese mice[J]. *Diabetologia*, 2013, 56(6): 1394-1402.
- (收稿日期:2015-04-15 修回日期:2015-05-16)

(上接第 4065 页)

[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(3):1712-1728.

[15] Bolen AL, Naren AP, Yarlagadda S, et al. The phospholipase A1 activity of lysophospholipase A- I links platelet activation to LPA production during blood coagulation[J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(5):958-970.

[16] Soga T, Ohishi T, Matsui T, et al. Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an