

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.34.002

过敏毒素 C3a 在健康人气道上皮间质转化中的作用研究*

李 竹¹, 刘代顺¹, 吴凯峰¹, 丁宏伟², 刘建英^{1△}

(1. 遵义医学院第三附属医院呼吸内科, 贵州遵义 563000; 2. 遵义医学院公共卫生学院, 贵州遵义 563000)

[摘要] **目的** 观察过敏毒素 C3a 在正常人气道上皮间质转化(EMT)中的作用及其相关分子机制。**方法** 培养正常人气道上皮细胞 BEAS-2B, 分为对照组, 重组人(rhC3a)刺激组, rhC3a+C3a 受体拮抗剂(C3aRA)的拮抗组, 通过显微镜观察细胞形态学变化情况; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞增殖能力; ELISA 检测细胞上清液中转化生长因子-β1(TGF-β1)的蛋白表达情况; RT-PCR 检测 C3a 受体(C3aR)和 EMT 相关指标 mRNA 变化情况; Western blot 检测 C3aR、Smad2/3、p38-MAPK 蛋白表达情况。**结果** 30、50 nmol/L rhC3a 刺激组细胞形态由正常鹅卵石样变为梭形, 加入 1 μmol/L C3aRA 拮抗组细胞形态较对照组比较无明显改变。50 nmol/L rhC3a 刺激组的细胞增殖较对照组降低($P=0.047$); 30 nmol/L rhC3a 刺激组中 TGF-β1 蛋白水平较对照组升高($P<0.05$), C3aR mRNA 及蛋白水平较对照组均升高($P<0.05$), p-Smad2/3、p-p38-MAPK 蛋白水平较对照组升高($P<0.05$), 加入 1 μmol/L C3aRA 可以降低以上指标表达($P<0.05$)。30 nmol/L rhC3a 刺激组中 α-平滑肌肌动蛋白、N-钙黏蛋白 mRNA 表达上调, E-钙黏蛋白 mRNA 表达下降, 加入 1 μmol/L C3aRA 可以拮抗这一过程($P<0.05$)。**结论** 过敏毒素 C3a 通过结合 C3aR, 诱导正常人气道上皮细胞发生 EMT, 其机制可能是通过激活 Smad2/3、p38-MAPK 通路来参与。

[关键词] 气道重塑; 纤维化; 过敏毒素 C3a; 上皮间质转化
[中图分类号] R714.253 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)34-4757-06

Study on the role of allergic toxin C3a in epithelial mesenchymal transition of normal human bronchial epithelium cells*
Li Zhu¹, Liu Daishun¹, Wu Kaifeng¹, Ding Hongwei², Liu Jianying^{1△}
(1. Department of Respiratory Medicine, Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China; 2. School of Public Health, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of anaphylatoxin C3a on epithelial mesenchymal transition(MTT) in normal human bronchial epithelium cells and its molecular mechanism. **Methods** Normal human bronchial epithelium cells BEAS-2B were cultured, and divided into control group, rhC3a stimulation group, rhC3a+C3a receptor(C3aRA) antagonist group, the morphological changes of cells were observed by microscope; cell proliferation was detected by MTT; the expression of TGF-β1 protein level in cell supernatant was evaluated by ELISA; the expression of C3aR mRNA and EMT related indicators mRNA changes were detected by RT-PCR; the expression of C3aR and Smad2/3, p38 MAPK pathway proteins were detected by Western blot. **Results** Cell morphology in 30, 50 nmol/L rhC3a stimulation group was changed from normal cobblestone like to spindle shape, cell morphology in C3aRA antagonist group had no significant change when compared with the control group. The cell proliferation was reduced in 50 nmol/L rhC3a stimulation group($P=0.047$); the levels of TGF-β1, p-Smad2/3, p-p38-MAPK protein were increased($P<0.05$), C3aR mRNA and protein levels were also significantly increased ($P<0.05$) in 30 nmol/L rhC3a stimulation group when compared with control group, but the addition of 1 μmol/L C3aRA could reduce their expressions($P<0.05$). 30 nmol/L rhC3a could induce the up regulation of α-SMA and N-cadherin mRNA, and decrease the expression of E-cadherin mRNA, adding 1 μmol/L C3aRA can antagonize this process ($P<0.05$). **Conclusion** Anaphylatoxin C3a can induce EMT in normal human bronchial epithelium cells by combining C3aR, its mechanism may be involved in activating Smad2/3 and p38-MAPK pathway.

[Key words] airway remodeling; fibrosis; anaphylatoxin C3a; epithelial mesenchymal transition

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是可治疗和可预防的一种限制性的不可逆气流受限的一组慢性肺部疾病。COPD 发病机制复杂, 气流受限通常是呈进行性发展, 小气道的纤维化和闭塞可能是导致呼吸道生理功能障碍的主要原因。近年来研究发现, 在 COPD 患者气道中, 尤其是吸烟者的气道上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)是活跃的。EMT 是上皮细胞逐渐转化为间充质样细胞并失去其上皮细胞的功能和特性的过程, 被认为参与气道重塑^[1]。补体系统参与机体的特异性和非特异性免

疫机制, 表现为抗微生物防御反应, 免疫调节及介导免疫病理的损伤性反应, 其中补体 C3 是补体系统中含量最高的成分, C3a 是补体 C3 活化过程中产生的裂解片段, 具有过敏毒素作用, 被报道参与气道炎症过程^[2]。最新研究表明, C3a 除具有促炎作用外, 有可能是一种新的促纤维化因子^[3]。有报道证实, C3a 能够促进肺纤维化, 与此同时阻断 C3a 与其受体 C3aR 的结合, 可以阻止肺纤维化的进展^[4]。但是, C3a 是否与气道 EMT 有关目前尚无报道。本课题旨在探讨过敏毒素 C3a 在正常人气道 EMT 中的作用及其相关分子机制, 期待为预防

* 基金项目: 贵州省科学技术基金(黔科合 J 字[2013]2310 号)。 作者简介: 李竹(1989—), 住院医师, 硕士, 主要从事慢性阻塞性肺疾病方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: lly2317@126.com。

COPD 气道重塑提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞与试剂 正常人气道上皮细胞 BEAS-2B(美国 ATCC 公司),重组人 C3a(rhC3a),ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司),C3aR 拮抗剂(C3aRA/SB290157,艾美捷科技公司),DMEM F12 培养基(美国 Hyclon 公司),胎牛血清(杭州四季青公司),四甲基偶氮唑蓝青链霉素(北京索莱宝公司),RT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司),兔抗-GAPDH 一抗、兔抗-C3aR、山羊抗兔-IgG/HRP、兔抗-p-Smad2/Smad3 一抗、兔抗-p-p38-MAPK 一抗(北京博奥森公司),兔抗-Smad2/Smad3、兔抗-MAPK14/P38 一抗(武汉博士德公司)。

1.1.2 实验仪器 生物安全柜、ND1000 核酸蛋白测定仪(美国 Thermo 公司),光学显微镜(日本 Olympus 公司),荧光显微镜(德国 Leica 公司),低温高速离心机、移液器(德国 Eppendorf 公司),Stax Fax2100 型酶标仪(美国 Awarn-er 公司),电泳槽、电泳仪、凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及形态观察 BEAS-2B 细胞用含 5% 胎牛血清的 DMEM F12 培养基,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,细胞密度达 70%~80% 传代,取对数生长期细胞进行实验。分为 3 组,培养细胞 0~72 h 后观察每组细胞形态变化情况。

1.2.2 四甲基偶氮唑蓝(MTT)细胞增殖实验 以每组每孔 1×10³ 个细胞接种于 96 孔板,加入 5% DMEM F12 培养 24 h,倒掉原培养基,加入无血清培养基饥饿 6 h,弃去培养基,加入不同浓度重组人 C3a 刺激,在 96 孔板周围一圈加入磷酸盐缓冲液(PBS),分别培养 1、24、48、72 h。吸去上清液,加入 90 μL 5% DMEM F12 继续培养 4 h,然后吸去上清液,每孔加入 110 μL Formazan 溶解液,置摇床上低速震荡 10 min,使结晶物充分溶解,在 ELISA 检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度(A)值。每组设置 3 个复孔,取平均值,绘制生长曲线,实验重复 3 次。

1.2.3 ELISA 检测细胞上清液中转化生长因子-β1(TGF-β1)的蛋白水平 将收集好的细胞上清液从-80℃ 冰箱取出置于冰盒上,在酶标包被板上设标准孔 10 孔,加样,分别设空白孔、待测样品孔,用封板膜封板后置 37℃ 温育 30 min,洗涤 5 次,拍干,每孔加入酶标试剂 50 μL,空白孔除外,再次温育 30 min(条件同前),洗涤 5 次,拍干,加入显色剂,37℃ 避光显色 15 min,每孔加入终止液 50 μL。在 15 min 以内,ELISA 检测仪 450 nm 处测量各孔的 A 值。

1.2.4 RT-PCR 检测不同基因 mRNA 的表达 不同组细胞待细胞密度达 80% 时,加入 1 mL Trizol 提取液提取细胞总 RNA,具体方法按照 TaKaRa RT-PCR 试剂盒说明书操作。PCR 引物由 Invitrogen 和上海生物工程公司合成,具体序列见表 1。

1.2.5 蛋白免疫印迹(Western blot)检测不同蛋白水平 以每组每孔 1×10⁶ 个细胞接种于 6 孔板,待细胞密度达 80% 时,加入 RIPA 裂解液提取蛋白,根据二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒说明书测定蛋白水平。30 μg 总蛋白在 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,迁移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜,5% 脱脂奶粉 4℃ 摇床封闭 2 h,洗膜,加入稀释好的相应一抗 4℃ 孵育过夜(不超过 18 h),洗膜,加入稀释好的二抗 37℃ 孵育 2 h,电化学发光(ECL)试剂盒检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件分析数据,计量资料

以 $\bar{x} \pm s$ 表示,GraphPad Prism Ver. 6.02 统计学软件作图,两组间的均数比较采用 *t* 检验,多组间均数的比较采用单因素方差分析,方差齐时用 LSD-*t* 检验,方差不齐用 Dunnett's *T* 检验进行组间两两均数比较,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 PCR 基因引物序列

基因	引物序列 5'-3'	大小 (bp)
β-actin	正向引物 AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT	285
	反向引物 GGG CAC GAA GGC CAT CAT T	
C3aR	正向引物 TCA CAG CCA TGG AAT GAG C	439
	反向引物 GGT ACA CGA ACA CAG GAA TGC	
E-cadherin	正向引物 CTT GGT CTA CGC CTG GGA CT	491
	反向引物 ATT CGG GCT TGT TGT CAT TC	
N-cadherin	正向引物 TCG GGT AAT CCT CCC AAA TC	298
	反向引物 CCT GGT CTT CTT CTC CTC CAC	
α-SMA	正向引物 GAG TTA CGA GTT GCC TGA TGG	347
	反向引物 GCT GGA AGG TGG ACA GAG AG	

2 结 果

2.1 rhC3a 诱导 BEAS-2B 细胞发生形态改变 正常 BEAS-2B 细胞形态呈鹅卵石或铺路石样,分别加入 10、30、50 nmol/L rhC3a 刺激细胞 0、24、48、72 h 后观察每组细胞形态变化情况。观察到 30、50 nmol/L 组细胞在 48、72 h,细胞由正常形态变为梭形或长条形,见图 1。

2.2 C3aRA 可以抑制 BEAS-2B 细胞发生形态改变 分别加入 30、50 nmol/L rhC3a 刺激细胞 30 min 后,加入 1 μmol/L C3aRA,观察到在 48、72 h 拮抗组细胞形态较刺激组未发生明显条形或梭形变,见图 2。

2.3 50 nmol/L rhC3a 降低 BEAS-2B 细胞的增殖 分别加入 0、10、30、50 nmol/L rhC3a 刺激 BEAS-2B 细胞 1、24、48、72 h,观察每组细胞的增殖情况。发现 50 nmol/L rhC3a 组在 72 h 较对照组和 10 nmol/L rhC3a 组比较,增殖下降,见表 2。

2.4 rhC3a 可以诱导 TGF-β1 水平的激活 用 ELASA 法检测各组细胞上清液中 TGF-β1 的蛋白水平结果发现,在不同时间点(12、24、48、72 h),30 nmol/L rhC3a 组中 TGF-β1 蛋白水平均显著高于对照组和 10 nmol/L rhC3a 组,加入 1 μmol/L C3aRA 均可以抑制 TGF-β1 的蛋白水平,见表 3。

2.5 rhC3a 可诱导 C3aR 活化,C3aRA 能够抑制 C3aR 的活化用 RT-PCR 法检测 C3aR 的 mRNA 水平,结果发现,在 48 h,30 nmol/L rhC3a 组中 C3aR 的 mRNA 水平显著高于对照组和 10 nmol/L rhC3a 组,加入 1 μmol/L C3aRA 可以抑制 C3aR mRNA 的水平,其中对照组(0 nmol/L rhC3a)、1 μmol/L C3aRA 组、10 nmol/L rhC3a 组、10 nmol/L rhC3a+1 μmol/L C3aRA 组、30 nmol/L rhC3a 组、30 nmol/L rhC3a+1 μmol/L

C3aRA 组中 C3aR mRNA 水平分别为 0.085 ± 0.018 、 0.078 ± 0.025 、 0.065 ± 0.020 、 0.097 ± 0.029 、 0.338 ± 0.031 、 0.092 ± 0.017 ,见图 3。另外,用 Western blot 法检测 C3aR 的蛋白水平,得到同样结果,30 nmol/L rhC3a 刺激细胞 48 h 后,C3aR 的蛋白水平显著高于对照组,加入 $1\ \mu\text{mol/L}$ C3aRA 可以抑制 C3aR 的蛋白水平,其中对照组(0 nmol/L rhC3a)、30 nmol/L rhC3a 组、30 nmol/L rhC3a + $1\ \mu\text{mol/L}$ C3aRA 组的 C3aR mRNA 表达水平分别为 0.835 ± 0.003 、 1.381 ± 0.016 、 1.315 ± 0.007 ,见图 4。

2.6 rhC3a 可诱导 BEAS-2B 细胞发生 EMT,C3aRA 能够抑制 EMT 过程 分为对照组(0 nmol/L rhC3a)、 $1\ \mu\text{mol/L}$ C3aRA 组、10 nmol/L rhC3a 组、10 nmol/L rhC3a + $1\ \mu\text{mol/L}$ C3aRA 组、30 nmol/L rhC3a 组、30 nmol/L rhC3a + $1\ \mu\text{mol/L}$

C3aRA 组,作用 48、72 h,用 RT-PCR 法检测 EMT 相关指标的 mRNA 水平。结果发现,10 nmol/L、30 nmol/L rhC3a 组细胞 48 h 和 72 h 后, α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)mRNA 水平较对照组和 $1\ \mu\text{mol/L}$ C3aRA 组升高,加入受体拮抗剂后可以抑制其 mRNA 水平的表达;在 48 h,仅 30 nmol/L rhC3a 组 N-钙黏蛋白(N-cadherin)mRNA 水平高于对照组,加入受体拮抗剂后可以抑制其 mRNA 水平的表达,在 72 h,10 nmol/L、30 nmol/L rhC3a 组 N-cadherin mRNA 水平均高于对照组,加入受体拮抗剂同样可以抑制其 mRNA 水平的表达,且 $1\ \mu\text{mol/L}$ C3aRA 组 N-cadherin 的 mRNA 水平低于对照组;在 30 nmol/L rhC3a 刺激 48、72 h 后,E-钙黏蛋白(E-cadherin)的 mRNA 水平较对照组降低,加入受体拮抗剂后其 mRNA 水平升高,见图 5,表 4、5。

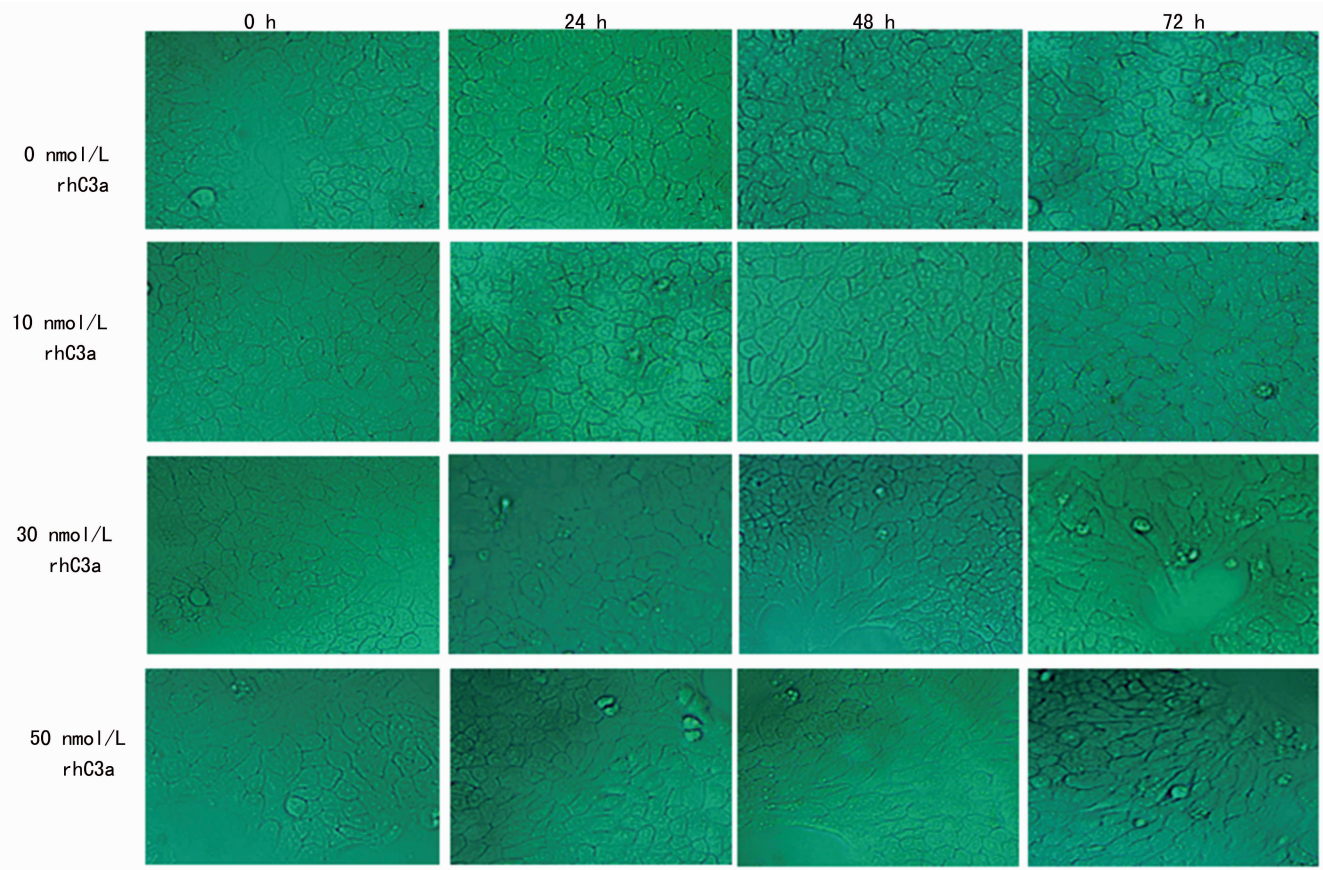


图 1 不同浓度 rhC3a 刺激 BEAS-2B 细胞后的形态变化情况(×200)

表 2 不同浓度 rhC3a 作用下 BEAS-2B 细胞的 A 值($\bar{x}\pm s,n=4$)

组别	rhC3a(nmol/L)	1 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0	0.109 ± 0.016	0.309 ± 0.035	0.302 ± 0.005	0.327 ± 0.025^a
rhC3a 组	10	0.109 ± 0.013	0.328 ± 0.059	0.322 ± 0.022	0.334 ± 0.017^a
	30	0.108 ± 0.011	0.342 ± 0.013	0.323 ± 0.027	0.312 ± 0.006
	50	0.107 ± 0.013	0.378 ± 0.042	0.328 ± 0.023	0.300 ± 0.007

^a: $P<0.05$,与 50 nmol/L rhC3a 组比较

表 3 不同浓度 rhC3a 联合 C3aRA 对 TGF- β 1 蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s,\text{ng/L},n=3$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组(0 nmol/L rhC3a)	61.55 ± 18.10	91.72 ± 10.34	102.07 ± 20.69	43.45 ± 17.24
10 nmol/L rhC3a 组	85.69 ± 25.00	138.28 ± 8.62	141.72 ± 5.17	71.90 ± 14.66

续表 3 不同浓度 rhC3a 联合 C3aRA 对 TGF-β1 蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s$,ng/L, $n=3$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
10 nmol/L rhC3a +1 μmol/L C3aRA 组	74.48±29.31	109.83±7.76	104.66±19.83	52.07±13.79
30 nmol/L rhC3a 组	150.34±10.34 ^a	264.14±60.34 ^a	287.41±83.62 ^a	115.08±4.93 ^a
30 nmol/L rhC3a +1 μmol/L C3aRA 组	71.90±25.00	103.91±6.03	173.62±19.83	61.55±28.45

^a: $P<0.05$,各组与 30 nmol/L rhC3a+1 nmol/L C3aRA 组比较

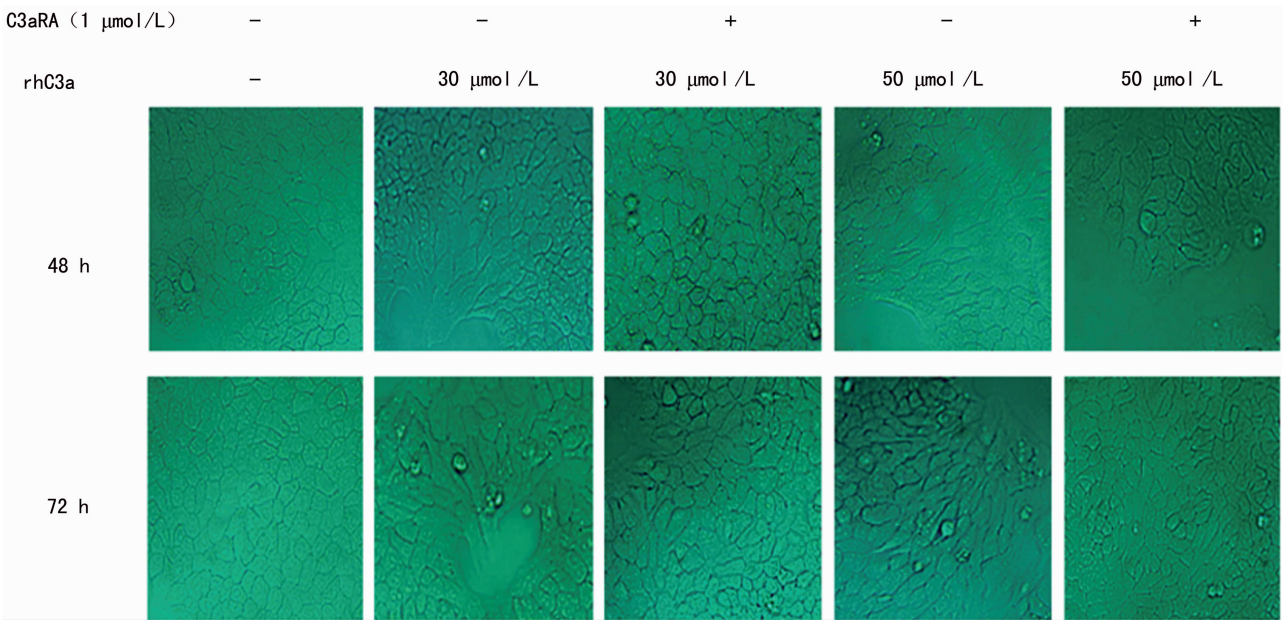


图 2 不同组 BEAS-2B 细胞的形态变化情况(×200)

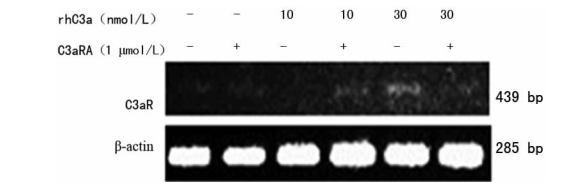


图 3 rh C3a 和 C3aRA 对 C3aR mRNA 水平的影响

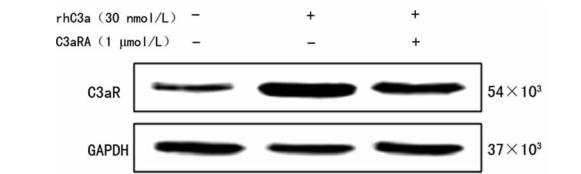
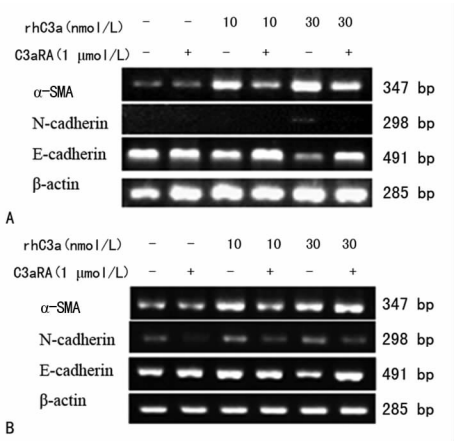


图 4 rhC3a 和 C3aRA 对 C3aR 蛋白水平的影响

2.7 rhC3a 对 Smad2/3、p38-MAPK 蛋白表达的影响 采用 30 nmol/L rhC3a 刺激 BEAS-2B 细胞 48 h,用 Western blot 检测 Smad2/3、p38-MAPK 的蛋白表达水平。结果发现,30 nmol/L rhC3a 组的 p-Smad2/3、p-p38-MAPK 蛋白水平较对照组(0 nmol/rhC3a)增加,加入受体拮抗剂可以抑制其蛋白的表

达,而总 Smad2/3($P=0.451$)、总 p38-MAPK($P=0.263$)的蛋白水平与对照组比较差异无统计学意义,见图 6、表 6。



A:作用 48 h;B:作用 72 h

图 5 rhC3a 和 C3aRA 对 EMT 相关指标 mRNA 水平的影响

表 4 不同浓度 rhC3a 联合 C3aRA 作用 48 h 对 EMT 相关指标 mRNA 水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	α-SMA/β-actin	N-cadherin/β-actin	E-cadherin/β-actin
对照组(0 nmol/L rhC3a)	0.811±0.069	0.027±0.012	1.087±0.087
1 μmol/L C3aRA	0.532±0.124	0.029±0.007	1.012±0.059
10 nmol/L rhC3a	1.004±0.217	0.023±0.005	0.833±0.116
10 nmol/L rhC3a+1 μmol/L C3aRA	1.000±0.208	0.495±0.115	1.079±0.150
30 nmol/L rhC3a	0.977±0.082	0.343±0.055	0.389±0.058
30 nmol/L rhC3a+1 μmol/L C3aRA	0.949±0.139	0.503±0.097	0.822±0.058

表 5 不同浓度 rhC3a 联合 C3aRA 作用 72 h 对 EMT 相关指标 mRNA 水平的影响(̄x±s,n=3)

组别	α-SMA/β-actin	N-cadherin/β-actin	E-cadherin/β-actin
对照组(0 nmol/L rhC3a)	0.466±0.091	0.476±0.051	0.737±0.125
1 μmol/L C3aRA	0.471±0.039	0.145±0.035	0.809±0.051
10 nmol/L rhC3a	1.336±0.267	0.707±0.059	0.795±0.053
10 nmol/L rhC3a+1 μmol/L C3aRA	0.590±0.058	0.300±0.058	0.762±0.059
30 nmol/L rhC3a	1.172±0.370	0.612±0.051	0.509±0.059
30 nmol/L rhC3a+1 μmol/L C3aRA	1.354±0.350	0.366±0.057	0.822±0.036

表 6 rhC3a、C3aRA 对 Smad2/3、p-p38-MAPK 蛋白及其磷酸化水平的影响(̄x±s,n=3)

组别	(Smad2/3)/GAPDH	(p-Smad2/3)/(Smad2/3)	p38-MAPK/GAPDH	p-p38-MAPK/p38MAPK
对照组(0 nmol/L rhC3a)	1.317±0.012	0.878±0.031	1.325±0.052	0.965±0.011
30 nmol/L rhC3a 组	1.321±0.021	0.987±0.021	1.329±0.042	1.038±0.010
30 nmol/L rhC3a+1 μmol/L C3aRA 组	1.318±0.022	0.914±0.010	1.322±0.044	0.876±0.031

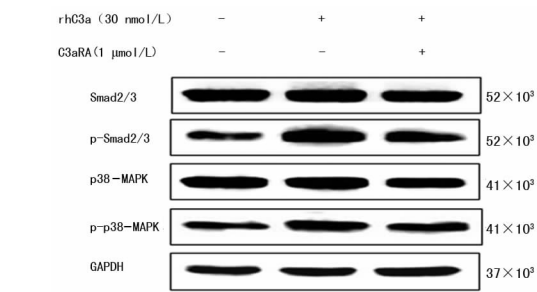


图 6 rhC3a 对 Smad2/3、p38 MAPK 通路的影响

3 讨 论

COPD 的主要特征在于小气道重塑与细支气管周围纤维化及肺气肿,其中,以小气道纤维化尤为重要^[5]。由于持续性的气流受限,COPD 患者的肺功能呈进行性减退,严重影响其劳动力和生活质量,并造成巨大的社会和经济负担。根据世界卫生组织统计,在 20 世纪有 1 亿人因 COPD 死亡^[6],2014 年发布的数据表明,至 2030 年 COPD 将上升成为全球第三大死亡原因^[7]。

目前认为 EMT 深入地参与了 COPD 的病理学改变。它涉及气道的纤维化和气流阻塞,也可能与 COPD 患者肺癌的高患病率有关^[8]。EMT 通过气道上皮细胞的活化变成成纤维细胞,而成纤维细胞通过刺激上皮细胞来刺激产生更多的 EMT,从而促进小气道狭窄和气流阻塞的恶性循环。从 COPD 患者气道活检中证实了各种蛋白质的表达上调,成为 EMT 的生物标记物。如 α-SMA,波形蛋白(vimentin)和纤维连接蛋白(fibronectin),负责组织重塑和纤维化^[9],参与间充质细胞蛋白的表达。E-cadherin 的表达下降,被认为是 EMT 上皮细胞的标记物,同时伴随 N-cadherin 的表达增加,这是间充质细胞的标记物,这种变化通常被称为“钙黏蛋白的转换”^[10]。

C3a 已被证实是一种促炎因子,在 COPD 患者的诱导痰和血清中表达均增加^[11]。在近年来的研究中表明,其的确有促纤维化作用,除了参与肺纤维化的过程以外,在肾脏疾病中,C3a 也可诱导肾小管上皮细胞发生 EMT,通过 C3aRA 可以减弱 TGF-β/Smad3 诱导的肾小管 EMT^[12-13]。目前,暂无 C3a 在气道 EMT 中的作用研究,但已有研究证实,促纤维化密切相关的因子 TGF-β1 能够促进气道 EMT 的发生^[14]。因此本研

究采用 rhC3a 刺激正常人气道上皮细胞,发现 TGF-β1 水平的激活,并证实了 C3aR 水平的活化,以及 EMT 的发生,而 C3aRA 则能够抑制这一过程,猜测 rhC3a 可能是 EMT 过程的上游信号分子。C3aRA 是 C3aR 的拮抗剂,通常拮抗剂阻断的是配体和受体的结合,而在本研究中能够抑制受体本身的水平,其中的具体机制尚不清楚^[15]。除此之外,有研究表明在人类肺泡和支气管上皮细胞系中,TGF-β1 可以通过激活 Smad2 诱导 EMT 的发生^[16]。尿激酶型纤溶酶原激活物受体(uPAR)信号通路通过激活许多细胞信号因子能够诱导 EMT 的发生,包括磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3k)、Src 家族激酶、Akt、ERK/MAPK 等^[17]。而本实验通过研究 C3a 与 Smad2/3、p38-MAPK 信号通路的关系,首次证实了 C3a 可以激活 Smad2/3、p38-MAPK 信号通路。

综上所述,C3a 通过结合 C3aR,可诱导正常人气道上皮细胞发生 EMT,其机制可能是通过激活 Smad2/3、p38-MAPK 通路来参与。本课题组今后也将继续深入研究其可能的机制并对相关动物模型进行探讨。C3a 有望成为气道重塑干预治疗的新靶点,对 COPD 的治疗和预后有着重大意义。

参考文献

[1] Bartis D, Bartis D, Mise N, et al. Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? [J]. Thorax, 2014, 69(8): 760-765.

[2] Marc MM, Korosec P, Kosnik M, et al. Complement factors C3a, C4a, and C5a in chronic obstructive pulmonary disease and asthma[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 31(2/1): 216-219.

[3] Tang Z, Lu B, Hatch E, et al. C3a mediates epithelial-to-mesenchymal transition in proteinuric nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(3): 593-603.

[4] Gu HM, Fisher AJ, Mickler EA, et al. Contribution of the anaphylatoxin receptors, C3aR and C5aR, to the pathogenesis of pulmonary fibrosis[J]. FASEB J, 2016, 30(6): 2336-2350.

[5] Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Lancet, 2004, 364

- (9435);709-721.
- [6] Laniado-Laborín R. Smoking and chronic obstructive pulmonary disease(COPD). Parallel epidemics of the 21 century[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2009, 6(1):209-224.
 - [7] Copd BO. WHO. Burden of COPD[EB/OL]. [2017-01-01]. <http://www.who.int/respiratory/copd/burden/en/>, 2016.
 - [8] Nowrin K, Sohal SS, Peterson GA, et al. Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental underlying pathogenic process in COPD airways; fibrosis, remodeling and cancer [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2014, 8(5):547-559.
 - [9] Günther A, Korfei M, Mahavadi P, et al. Unravelling the progressive pathophysiology of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Eur Respir Rev*, 2012, 21(124):152-160.
 - [10] Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6):1429-1437.
 - [11] Zhang J, Yao WZ, Chen YH. Change in airway anaphylatoxin-complement factors C3a of sputum in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 2011, 43(3):446-449.
 - [12] Li L, Yin QH, Tang X, et al. C3a receptor antagonist ameliorates inflammatory and fibrotic signals in type 2 dia-
 - betic nephropathy by suppressing the activation of TGF-beta/smad3 and IKB alpha pathway[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e113639.
 - [13] Li L, Chen LJ, Zang J, et al. C3a and C5a receptor antagonists ameliorate endothelial-myofibroblast transition via the Wnt/beta-catenin signaling pathway in diabetic kidney disease[J]. *Metabolism*, 2015, 64(5):597-610.
 - [14] Gohy ST, Hupin C, Fregimilicka C, et al. Imprinting of the COPD airway epithelium for dedifferentiation and mesenchymal transition[J]. *Eur Respir J*, 2015, 45(5):1258-1272.
 - [15] Lim J, Iyer A, Suen JY, et al. C5aR and C3aR antagonists each inhibit diet-induced obesity, metabolic dysfunction, and adipocyte and macrophage signaling[J]. *FASEB J*, 2013, 27(2):822-831.
 - [16] Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition[J]. *Cell Res*, 2009, 19(2):156-172.
 - [17] Lester RD, Jo M, Montel V, et al. uPAR induces epithelial-mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells [J]. *J Cell Biol*, 2007, 178(3):425-436.

(收稿日期:2017-08-21 修回日期:2017-09-29)

(上接第 4756 页)

- transition(EMT) and multidrug resistance(MDR) of ovarian cancer cells[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(10):2004-2010.
- [2] 马泳泳, 黄进, 周淑娟, 等. 姜黄素对骨髓瘤细胞迁移和侵袭能力的影响及其机制研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(1):170-174.
 - [3] 刘斌, 邓辰亮, 杨松林, 等. 姜黄素对人黑色素瘤细胞凋亡机制探讨[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(14):1059-1062.
 - [4] Liao S, Xia J, Chen Z, et al. Inhibitory effect of curcumin on oral carcinoma CAL-27 cells via suppression of Notch-1 and NF- κ B signaling pathways [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(4):1055-1065.
 - [5] 曹一波, 于君, 马晶, 等. 姜黄素对胶质瘤 U87 增殖和迁移能力的影响[J]. *解放军医药杂志*, 2014, 26(5):19-26.
 - [6] 石松林, 陈兰英, 刘用金, 等. 姜黄素诱导人食管癌 EC9706 细胞凋亡过程中核磷蛋白的表达与定位变化[J]. *解剖学报*, 2014, 45(2):221-227.
 - [7] Radisky S, Radisky C. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010, 15(2):201-212.
 - [8] 马平川, 何宏月, 王芳, 等. 上皮间质转化相关蛋白 E-cadherin、N-cadherin 及 Snail 在子宫内膜异位症相关卵巢癌的表达及意义[J]. *实用妇产科杂志*, 2016, 32(3):211-215.
 - [9] 田若楠, 孙剑经, 张林西. 姜黄素抗食管癌的机制[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2016, 43(5):379-381.
 - [10] Felipe LJ, Nofech-Mozes S, Bayani J, et al. EMT in breast carcinoma—a review[J]. *J Clin Med*, 2016, 5(7):65-79.
 - [11] 吉鸿, 卢桂芳, 单涛, 等. 姜黄素通过 NF- κ B-Snail 信号通路抑制 LPS 诱导的乳腺癌细胞上皮间质化[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2014, 35(3):399-404.
 - [12] Cichon A, Nelson M, Radisky C. Regulation of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells by cell contact and adhesion[J]. *Cancer Inform*, 2015, 14(Suppl 3):1-13.
 - [13] Huang T, Chen Z, Fang L. Curcumin inhibits LPS-induced EMT through downregulation of NF- κ B-Snail signaling in breast cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(1):117-124.
 - [14] Qin Y, Zhao D, Zhou G, et al. Apigenin inhibits NF- κ B and snail signaling, EMT and metastasis in human hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(27):41421-41431.
 - [15] Wang M, Ren D, Guo W, et al. N-cadherin promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like traits via ErbB signaling in prostate cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(2):595-606.

(收稿日期:2017-08-20 修回日期:2017-09-28)