文章编号:1000-5404(2005)17-1752-04

论著

蛋白酶激活受体1介导人肺上皮细胞分泌MCP-1

王海燕,何韶衡,郑燕珊 (汕头大学医学院变态反应学与炎症学研究所,汕头 515031)

提 要:目的 探讨蛋白酶激活受体1(protease-activated receptors1, PAR1)激动肽和凝血酶对人肺上皮细胞单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)分泌的影响。**方法** 人肺上皮细胞系A549细胞分别接种于12孔培养板各孔内,并分别用不同浓度的PAR1激动肽SFLLR和反PAR1激动肽RLLFS以及不同浓度的凝血酶和/或凝血酶抑制剂水蛭素进行刺激,刺激时间为2、16 h。用ELISA方法检测上清液中的MCP-1水平。**结果** 经过16 h的培养,PAR1激动剂SFLLR可引起浓度相关性MCP-1的释放增加,增加到300 μmol/L时诱导MCP-1的释放量比基础分泌量增加了近12倍,反PAR1激动剂RLLFS不能引起MCP-1的释放增加。凝血酶也可引起浓度相关性MCP-1释放,凝血酶在浓度3 000 U/L时就可引起MCP-1释放量增加,10 000 U/L时诱导MCP-1的释放量达高峰,为基础分泌量的5倍。凝血酶抑制剂水蛭素可以抑制凝血酶对MCP-1的释放作用。时间相关曲线表明,从2 h起即可引起PAR1介导的MCP-1释放增加,16 h达高峰。**结论** PAR1激动肽和凝血酶可促进人肺上皮细胞分泌MCP-1,PAR1拮抗剂和凝血酶抑制剂可能具有抗炎作用。

关键词: 蛋白酶激活受体;上皮细胞系;单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)

中图法分类号: R322.35; R392.11; R394.2 **文献标识码:** A

Protease-activated receptor 1 challenges human lung epithelial cells to produce MCP-1

WANG Hai-Yan, HE Shao-heng, ZHENG Yan-shan (Allergy and Inflammation Research Institute, Medical College of Shantou University, Shantou 515031, China)

Abstract: Objective To investigate the actions of PAR1 agonists and thrombin on the secretion of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 from human lung epithelial cells. **Methods** A549 cells were cultured in a 12-well culture plate. The challenge was performed by addition of various concentrations of PAR1 agonist peptides SFLLR and its reverse peptides RLLFS, thrombin or thrombin inhibitor named hirudin into each well, respectively. After 2 h or 16 h, the reactions were terminated by removal of the supernatant from each well. A sandwich ELISA was used to determine the levels of MCP-1 in supernatants. **Results** Following 16 h incubation, SFLLR could induce concentration-dependent secretion of MCP-1. The maximum release of MCP-1 was nearly 12-fold more than baseline release. The reverse PAR1 agonists had little effects on MCP-1 release. Thrombin could induce concentration-dependent secretion of MCP-1. As low as 3 000 U/L thrombin could induce MCP-1 release from epithelial cells, and the maximum of accumulated release of MCP-1 was observed with 10 000 U/L thrombin, which was 5-fold more than baseline release. Thrombin inhibitor hirudin could inhibit thrombin induced secretion of MCP-1. The time course showed that the actions of PAR1 agonist peptides SFLLR and thrombin initiated at 2 h and reached their peak at 16 h. **Conclusion** PAR1 agonist peptides and thrombin are potent secretogogue of MCP-1 release from cultured human lung epithelial cells, and PAR1 antagonists and thrombin inhibitor may possess the ability to inhibit airway inflammation.

Key words: protease-activated receptors; epithelial cell line; monocyte chemoattractant protein-1

蛋白酶激活受体(protease-activated receptors, PARs)属G蛋白耦联受体家族,目前共发现4个成员:PAR1、PAR2、PAR3、PAR4。蛋白酶可以酶切PARs的N末端,暴露含有系锁配体的新的N末端,可自我激活PARs功能,激活的PARs引起信号级联反应,最终影响细胞的形状、参与细胞的分泌、整合蛋白的活化、代谢反应、转录过程及细胞运动等多种功能。PARs分布在多种组织细胞上,包括血小板、白细胞、肥大细胞、

基金项目: 广东省科技计划资助重点项目(2003B31502),李嘉诚基金资助项目(C0200001)
Supported by the Key Program of Guangdong Sci & Tech Research Project (2003B31502) and the LiKaShing Foundation of Hong Kong (C0200001)

作者简介: 王海燕(1969-),女,山东省济南市人,博士研究生,讲师,主要从事炎症与变态反应学方面的研究。电话:(0754)8900380,E-mail:hywang@stu.edu.cn

通讯作者: 何韶衡,电话:(0754)8900405,E-mail:shoahenghe@hotmail.com

收稿日期: 2005-03-28;**修回日期:** 2005-06-19

内皮细胞、血管平滑肌细胞、成纤维细胞、消化道上皮细胞等[1]。

PARs 在炎症中的作用引起了广泛的关注，单核细胞趋化蛋白（monocyte chemoattractant protein，MCP）-1 属趋化因子 CC 亚家族中的一员，主要由上皮细胞、单核细胞、成纤维细胞等细胞产生，可以趋化、激活 T 细胞和单核细胞，激活碱性粒细胞[2,3]，参与炎症过程。我们曾证明，PAR2 可介导人肺上皮细胞分泌趋化因子 MCP-1[4]。PAR1 作为发现最早的蛋白酶激活受体同样参与多种炎症反应，PAR1 作为凝血酶的高亲和力受体，能介导中性粒细胞脱颗粒[5]，通过因子 Xa 诱导内皮细胞释放细胞因子和表达粘附分子引起血管舒张，介导血浆外渗、粒细胞浸润和水肿形成[6]。除凝血酶外，PAR1 还可被与系锁配体序列相同的多肽即激动肽所激活从而参与细胞的功能。最近发现肺上皮细胞表达 PAR1，我们利用人肺上皮细胞系 A549 研究 PAR1 在肺部的前炎症介质 MCP-1 释放中的作用。

1　材料与方法

1.1　材料

PAR1 激动剂 SFLLR 和反 PAR1 激动剂 RLLFS 由美联生物科技有限公司（西安）合成。人凝血酶、青链霉素购于 Sigma 公司，凝血酶抑制剂水蛭素为 Calbiochem 产品，DMEM 培养液、胎牛血清（FBS）、胰蛋白酶-EDTA 消化液均购自 Gibco 公司，人 MCP-1 ELISA 检测试剂盒为 pierce 公司产品。

1.2　方法

人肺癌上皮细胞系 A549 细胞（购自中国科学院上海细胞研究所）接种于 50 ml 培养瓶内，用 DMEM 完全培养液（含 100 ml/L FBS、100 mg/L 青/链霉素），于 37 ℃，50 ml/L CO_2 培养箱中培养。待细胞铺满瓶底后，用 2.5 g/L 胰蛋白酶-EDTA 消化液消化，将获得的细胞分种于 12 孔培养板各孔内，用 2 ml 完全培养液培养至细胞相互融合后，换无血清培养液培养 16 h。本项目共分 6 组：SFLLR、RLLFS、凝血酶、水蛭素、水蛭素 + 凝血酶各 1 组和激发对照组。激发实验由向每孔的细胞内加入不同浓度的 PAR-1 激动剂 SFLLR 或反 PAR-1 激动剂 RLLFS（0.1 ~ 300 μmol/L）及凝血酶（$0.01 \times 10^3 \sim 10 \times 10^3$ U/L）和/或相应浓度的水蛭素，分别培养 2、16 h 后收获细胞上清液，上清液离心后于 -80 ℃冻存，准备用于 ELISA 检测。每组实验均重复 5 次。人 MCP-1 检测用人 MCP-1 ELISA 检测试剂盒，按操作说明检测细胞上清液中的 MCP-1 水平，并用酶标仪于 450nm 波长处测定吸光度 $D(450)$ 值。

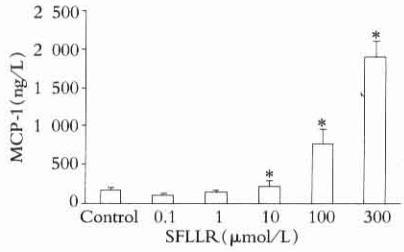
1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 版软件，组间数据的比较用单因素方差分析，组间方差不齐时，采用非参数方法。

2　结果

2.1　PAR1 激动剂对肺上皮细胞 MCP-1 释放的影响

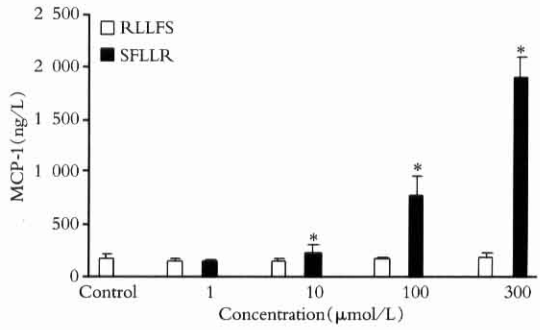
经过 16 h 的培养，PAR1 激动剂 SFLLR 可引起浓度相关性 MCP-1 的释放增加，SFLLR 在浓度 10 μmol/L 时就可引起 MCP-1 释放增加，增加到 300 μmol/L 时诱导 MCP-1 的释放量比基础分泌量增加了近 12 倍（图 1）。反 PAR1 激动剂 RLLFS 不能引起 MCP-1 的释放增加（图 2）。



*：$P<0.05$，*vs* control

图 1　PAR1 激动剂对 A549 细胞 MCP-1 释放的影响

Fig 1　Effects of PAR1 agonist peptides on the release of MCP-1 from A549 cells

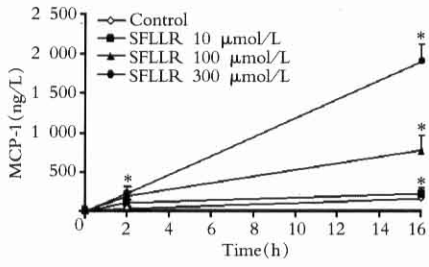


*：$P<0.05$，*vs* corresponding concentration of reverse peptide

图 2　PAR1 激动剂及其对照多肽对 A549 细胞 MCP-1 释放的影响

Fig 2　Effects of PAR1 agonists and their reverse peptides on the release of MCP-1 from A549 cells

不同浓度的 SFLLR 与 A549 细胞分别培养 2、16 h，结果显示，SFLLR 作用 2 h 即可引起 MCP-1 分泌增加，随着药物作用时间的延长，MCP-1 的释放量显著增加，具有明显的时间相关性（图 3）。反 PAR1 激动剂 RLLFS 随着药物作用时间的延长，未能引起 MCP-1 释放量的增加。



*：$P<0.05$，*vs* corresponding control

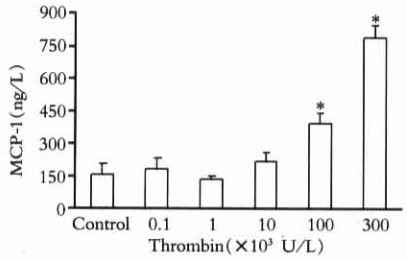
图 3　蛋白酶激动肽诱导 MCP-1 释放的时间关系

Fig 3　Time course for MCP-1 release induced by agonist peptides

2.2　凝血酶对肺上皮细胞系 MCP-1 释放的影响

经过 16 h 的培养，凝血酶可引起浓度相关性 MCP-1 释放增加，凝血酶在浓度 3×10^3 U/L 时就可引起 MCP-1 释放量增

加,10 $\times 10^3$ U/L 时诱导 MCP-1 的释放量达高峰,为基础分泌量的5倍(图4)。

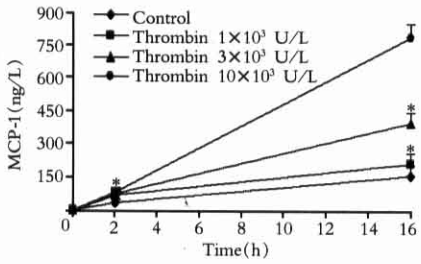


*: $P<0.05$, *vs* control

图4 凝血酶对 A549 细胞释放 MCP-1 的影响

Fig 4 Effect of thrombin on the release of MCP-1 from A549 cells incubated with thrombin for 16 h

时间关系曲线显示,凝血酶引起 A549 细胞分泌 MCP-1 的量从2 h起就有所增加,作用16 h时 MCP-1 的聚集量增加最显著(图5)。



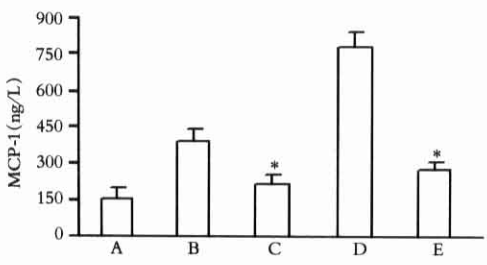
*: $P<0.05$, *vs* corresponding control

图5 凝血酶引起 MCP-1 释放的时间关系曲线

Fig 5 Time course for MCP-1 release induced by thrombin

2.3 凝血酶抑制剂对凝血酶释放 MCP-1 的抑制作用

水蛭素和凝血酶与 A549 细胞共同培养16 h后结果显示:水蛭素本身不能影响 MCP-1 的分泌,但水蛭素在浓度为 3×10^3 U/L 和 10×10^3 U/L 时可分别抑制相应浓度凝血酶刺激 A549 细胞释放 MCP-1 的作用(图6)。



A: Control; B: Thrombin 3; C: Thrombin + H3; D: tHROMBIN 10; E: Thrombin + H10; *: $P<0.05$, *vs* corresponding thrombin alone

图6 水蛭素对凝血酶诱导 MCP-1 释放的抑制作用

Fig 6 Inhibition effect of hirudin on the release of MCP-1 from A549 cells induced by thrombin

3 讨论

PARs 属 G 蛋白耦联受体家族中的亚类,最初是在研究血液凝固和血小板激活相互作用机制中得以确认,最初的研究多集中在损伤修复和创伤愈合方面。最近,PARs 在炎症和变态反应性疾病中的作用日益得到关注和重视[8,9]。

PAR1 激动剂刺激呼吸道上皮细胞可引起高达12倍的 MCP-1 释放,表明其对 MCP-1 的释放的促进作用是高效的,足以在体内引起炎症反应,也暗示肥大细胞分泌的类糜蛋白酶和呼吸道上皮细胞之间可能存在着直接的关系。PAR1 激动剂对 MCP-1 分泌的刺激作用明显强于它们相对应的反肽,更说明这种刺激作用是具有特异性的,而不是对肽类的一种无选择性的反应。PAR1 拮抗剂可能具有抗炎作用。

凝血酶作为体内的主要凝血因子之一,主要参与机体凝血、止血功能。凝血酶可激活 PAR1、PAR3 和 PAR4,PAR1 作为凝血酶的高亲和力受体,参与多种炎症反应过程[10,11]。我们的实验显示,凝血酶可引起肺上皮细胞高达5倍的 MCP-1 释放,表明蛋白酶对 MCP-1 的释放促进作用是有效的。同时提示,蛋白酶除了能够水解组织中的特异性底物外,还可以通过 PARs 受体刺激细胞分泌促炎介质,从而加重炎症的发展,为进一步理解炎症性介质间的相互作用提供了新的思路。凝血酶对呼吸道上皮细胞 MCP-1 分泌的促进作用表明在肥大细胞分泌的类糜蛋白酶和呼吸道上皮细胞之间可能存在着直接的联系[12],又一次间接证明了肥大细胞在哮喘和慢性阻塞性肺疾病的发病过程中起着一定的作用。

凝血酶活性抑制剂水蛭素可以抑制凝血酶对 MCP-1 的释放作用,表明凝血酶的作用是通过其水解活性实现的,也表明凝血酶抑制剂可能有抗炎作用。

从时间关系曲线上看,PAR1 激动剂和凝血酶对 MCP-1 分泌的刺激作用是一个比较缓慢的过程,这可能表明分泌出的 MCP-1 是由上皮细胞新合成的,而不是原有贮存的 MCP-1 的单纯释放,但具体分泌机制还有待于进一步探索。已经证明,凝血酶通过 p38 MAPK 信号途径诱导 MCP-1 产生[13]。

我们已经证明,A549 细胞系可同时表达 PAR1~4 4种受体,而凝血酶既可激活 PAR1 受体又是 PAR3 和 PAR4 的激活剂。因此,凝血酶引起的肺上皮细胞 MCP-1 的释放,是单纯由 PAR1 介导,还是 PAR3 与 PAR4 同时参与,须经进一步的实验证实。

趋化因子 MCP-1 可由包括 LPS 刺激的单核细胞、凝血酶激活的血管平滑肌细胞及内皮细胞产生。我们

首次证实了凝血酶及 PAR1 激动剂激活 PAR1 可刺激肺上皮细胞表达 MCP-1，提示了凝血酶与肺部炎症间存在一定的关联。

参考文献：

[1] Macfarlane S R, Seatter M J, Kanke T, *et al*. Proteinase-activated receptors[J]. Pharmacol Res, 2001, 53(2): 245 - 282.

[2] Jiang Y, Beller D I, Frendl G, *et al*. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes[J]. J Immunol, 1992, 148(8): 2423 - 2428.

[3] Baggiolini M, Dahinden C A. CC chemokines in allergic inflammation [J]. Immunol Today, 1994, 15 (3): 127 - 133.

[4] 王海燕，何韶衡. 蛋白酶激活受体 2 激动剂诱导上皮细胞分泌 MCP-1[J]. 第四军医大学学报，2004，25(19)：1782 - 1784.

[5] Kannan S. Role of protease-activated receptors in neutrophil degranulation[J]. Med Hypotheses, 2002, 59(3): 266 - 267.

[6] Camerer E, Kataoka H, Kahn M, *et al*. Genetic evidence that protease-activated receptors mediate factor Xa signaling in endothelial cells [J]. J Biol Chem, 2002, 277(18): 16081 - 16087.

[7] Coughlin S R, Camerer E. PARticipation in inflammation[J]. J Clin Invest, 2003, 111(1): 25 - 27.

[8] Asokananthan N, Graham P T, Fink J, *et al*. Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E_2 release from human respiratory epithelial cells [J]. J Immunol, 2002, 68(7): 3577 - 3585.

[9] 王　震，陶国才. PARs 受体家族与血管内皮屏障功能调节[J]. 第三军医大学学报，2004，26(22)：2077 - 2078.

[10] Cunningham M A, Rondeau E, Chen X, *et al*. Protease-activated receptor 1 mediates thrombin-dependent, cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis[J]. J Exp Med, 2000, 191 (3): 455 - 462.

[11] Marty I, Peclat V, Kirdaite G, *et al*. Amelioration of collagen-induced arthritis by thrombin inhibition[J]. J Clin Invest, 2001, 107 (5): 631 - 640.

[12] Tomimori Y, Muto T, Fukami H, *et al*. Chymase participates in chronic dermatitis by inducing eosinophil infiltration[J]. Lab Invest, 2002, 82(6): 789 - 794.

[13] Burysek L, Syrovets T, Simmet T. The serine protease plasmin triggers expression of MCP-1 and CD40 in human primary monocytes via activation of p38 MAPK and janus kinase (JAK)/STAT signaling pathways[J]. J Biol Chem, 2002, 277(36): 33509 - 33517.

（编辑　王　红）

（上接 1751 页）

为 0.40，2 例嗜酸性细胞正常。

1.4　诊断

根据牧区生活史，有牛羊接触史，伴有游走性疼痛，均被查出幼虫，既可诊断。

1.5　治疗和随访

10 例患者首先予以心理疏导，解除自卑和恐惧，树立战胜疾病的信心，3 例进行切开取虫，5 例自行挤压后取出，2 例自行排除，均予以氯喹 0.25 g 口服，2 次/d，共服 4 周。随访 3 年，6 例 1 年后幼虫全部排净，3 例 2 年后幼虫全部排净，1 例 3 年后幼虫全部排净，随访 3 年中，未发现内脏损害者，均完全恢复正常。

2　讨论

皮肤蝇蛆病是由某些蝇类幼虫进入皮肤引起炎症反应。由于蝇的种类和习性不同，其感染方式可分为 3 种：①蝇直接产卵于皮肤上或衣物上，孵化后幼虫穿过正常皮肤而寄生皮下组织内。②某些带有蝇卵的蚊虫当吮吸人血时将卵带到皮肤上，孵化后幼虫通过蚊子刺吸伤口进入皮内。③蝇直接产卵于创伤处，孵化后的蛆即寄生在局部创伤组织内[1]。由于流动人口增加，该病从牧区发展到农业区、城市，甚至内地省份，如本研究就有 4 例患者从牧区调入城市中工作和生活的患者。发病年龄儿童和妇女较多，这与牛羊的密切接触有关，患者中以少数民族居多，我省以藏族为主，有明显外伤史者少数，10 例均有明显马、牛、羊接触史，10 例均有蝇、蚊虫直接、间接接触史，发病季节以 3、5 月份居多。所有患者均对其疾病有自卑和恐惧感，临床表现以疖肿型为多，无明显好发部位，很少为单个幼虫，大多为数个幼虫以上，大多数有游走型疼痛，目前未发现幼虫进入心、脑、肝、肾等重要脏器，也未发现伴有内脏损害者。从虫体形态学来讲，我省广大牧区仍以牛皮蝇Ⅱ龄幼虫多见，这与已报道过的有关文献相符合[3]，大多数蝇蛆病嗜酸细胞升高，这与大多数报道相一致[1]，皮肤蝇蛆病是人畜共患病，对人畜健康危害很大。幼虫在体内活动时，可产生多种酶，尤其是蛋白分解酶。此外还有一些毒素，对人畜的血液和血管壁引起不良反应，可以致敏和人畜贫血消瘦。对于牛幼虫钻出的部位多在背部，有的可造成多个孔洞。皮肤损害严重。幼虫在人体内皮下游走时，可造成皮肤线状隆起。如脉管炎样，幼虫每天移行约 10 ~ 20 cm，自觉疼痛。有时也可见到幼虫移行部位的风团。皮下瘀斑，淋巴结肿大等体征出现，待疖样损害挤出蝇蛆时，引起恐惧。预防的根本措施是灭蝇[2]，灭蝇药物当前首推溴氰菊酯，此药对于蝇是触杀，喷药后 3 min 即可击倒。

关键词：皮肤蝇蛆病；临床分析

中图法分类号：R535　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 杨国亮，王侠生. 现代皮肤病学[M]. 上海：上海医科大学出版社，2000. 327 - 328.

[2] 徐秉锟，赵慰先. 人体寄生虫学[M]. 第 2 版. 北京：人民卫生出版社，1986. 225 - 226.

[3] 王　晓. 皮肤蝇蛆病 1 例报告[J]. 皮肤病与性病，1996，18(1)：88.

（编辑　薛国文）