文章编号:1000-5404(2006)06-0491-03

论著

核转录因子 κB 在 TNF-α 诱导人气道上皮细胞 hBD-2 表达中的作用

廖 伟[1],钱桂生[1],雷 撼[2],黄桂君[1],张 方[1]([1]第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037;[2]上海市东方医院呼吸内科,上海 200120)

提 要:目的 观察肿瘤坏死因子-α(TNF-α)诱导人气道上皮细胞人β防御素-2(hBD-2)的表达及核转录因子 κB(NF-κB)在hBD-2表达中的作用。**方法** 用TNF-α和或NF-κB抑制剂PDTC处理体外培养人气道原代上皮细胞,RT-PCR法检测hBD-2 mRNA的表达,Western blot检测细胞质IκB-α蛋白活性变化,凝胶迁移试验(EMSA)检测不同时相NF-κB活性的变化。**结果** TNF-α刺激0.5 h后可见人气道上皮细胞hBD-2 mRNA表达,并呈时间依赖性;PDTC可抑制hBD-2 mRNA表达;NF-κB在TNF-α刺激1 h后明显活化,抗体超迁移率实验结果显示p65-p50异型二聚体NF-κB参与了NF-κB的活化。**结论** 一定剂量的TNF-α可诱导人气道上皮细胞hBD-2 mRNA表达,NF-κB在TNF-α诱导气道上皮细胞hBD-2 mRNA起重要的调控作用。

关键词: 人气道上皮细胞;人β防御素-2;肿瘤坏死因子-α;核转录因子 κB
中图法分类号: R322.34;R394-33;R394.3 **文献标识码:** A

Roles of NF-κB in expression of hBD-2 mRNA in human primary epithelial cells induced by TNF-α

LIAO Wei[1], QIAN Gui-sheng[1], LEI Han[2], HUANG Gui-jun[1], ZHANG Fang[1]([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Department of Respiratory Diseases, Shanghai East Hospital, Shanghai 200120, China)

Abstract: Objective To explore the roles of NF-κB in expression of human β-defensin-2 (hBD-2) mRNA induced by TNF-α in the human airway primary epithelial cells. **Methods** After the human bronchial primary epithelial cells were stimulated with TNF-α or first with NF-κB inhibitor PDTC, then TNF-α, the expression of hBD-2 mRNA was detected by RT-PCR. The IκB-α protein level in the cytoplasm was detected by Western blotting and the nuclear factor-kappa B (NF-κB) binding activity was analyzed by electrophoretic mobility shift assays. **Results** The hBD-2 mRNA could be detected after 2.5 h of TNF-α stimulation and expressed in a dose-dependent manner. The NF-κB could be activated after 0.5 h of TNF-α stimulation. The supershifts assays indicated that the p65 – p50 heterodimer formed complexes of NF-κB were involved in the activated of NF-κB. **Conclusion** TNF-α can induce the expression of hBD-2 mRNA in a dose-dependent manner. The p65 – p50 heterodimer formed complexes of NF-KB play an important role in the regulation of hBD-2 gene expression in response to TNF-α.

Key words: human, airway epithelium; human β-defensin-2; TNF-α; nuclear factor-kappa B

防御素(defensin)是动、植物天然免疫的重要介质,其中人β防御素-2(human β-defensin-2, hBD-2)是最早发现的可诱导表达的人防御素,在气道的先天性免疫和后天性免疫均有重要作用[1]。目前的研究表明,不同部位的上皮细胞在不同的刺激因素作用下,hBD-2表达的信号通路不同。因此,本研究以人气道原代上皮细胞为研究对象,观察肿瘤坏死因子-α(TNF-α)诱导人气道上皮细胞hBD-2表达及NF-κB活性的变化,以期阐明NF-κB在hBD-2表达中的作用,为人工调控气道上皮细胞hBD-2表达防治呼吸道感染打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂材料

TNF-α(Peprotech公司)、吡咯二硫氨基甲酸酯(PDTC)、蛋白酶XⅣ、DMEM/F12培养基、胰岛素、人胎盘胶原及表皮生长因子均为Sigma公司产品,通用型RT-PCR试剂盒(北京鼎国生物技术公司),Western blot试剂盒(武汉博士德公司),EMSA试剂盒(No:3353591,Roche公司),hBD-2引物及NF-κB探针由大连宝生物工程有限公司合成。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270592)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30270592)
作者简介: 廖 伟(1971-),男,四川省平昌县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事呼吸道感染防治方面研究。电话:(023)68755320
通讯作者: 钱桂生,电话:(023)68755603
收稿日期: 2005-04-19;**修回日期:** 2006-01-16

1.2 分离、培养人气道原代上皮细胞

参照黄宁等[2]的方法，略作改动，经患者同意，取我院胸外科同期作肺叶切除术患者的肺叶支气管标本，无菌条件下，用冰冷 PBS 冲洗，纵向切开气管，置于含蛋白酶XⅣ型的 PBS 中，4 ℃过夜消化，用细胞刮轻轻刮下上皮细胞，吸管轻轻吹打数分钟，用含 5% FCS 的 DMEM/F12 培养基 37 ℃，5% 的 CO_2 培养（涂有人胎盘胶原的塑料培养皿），24 h 后换为含表皮生长因子、胰岛素、氢化可的松的 DMEM/F12 无血清培养基，培养 5 d，并用角蛋白免疫组化鉴定（另文发表）。

1.3 用 TNF-α 及 PDTC 作用于上皮细胞

用 10 ng/ml 的 TNF-α 刺激培养的原代上皮细胞，或用一定浓度的 PDTC（100 μmol/L）预处理上皮细胞 2 h，再用 TNF-α 刺激，收集不同时相点细胞提取总 RNA、胞浆蛋白及细胞核蛋白，每个试验均重复进行 3 次。

1.4 用 RT-PCR 检测 hBD-2 mRMA 表达

1.4.1 总 RNA 提取　用 Tripure 一步法抽提。

1.4.2 RT-PCR 扩增　RT：取等量（约 2 μg）总 RNA，1 μl 随机引物，dNTP 0.5 mmol/L，总体积 20 μl，照 RT-PCR 试剂盒说明书执行。反应条件为 95 ℃变性 5 min；94 ℃ 60 s，62 ℃ 30 s，72 ℃ 120 s，共 35 个循环；72 ℃延伸 5 min。设阳性对照（GAPDH，产物长 579 bp）。hBD-2 跨内含子引物：上游：5′-CCAGCCATCAGCCATGAGGGT-3′，下游：5′-GGAGCCCTTTCT-GAATCCGCA-3′，产物长 255 bp。

1.5 Western blot 检测细胞质 IκB-α 活性

1.5.1 胞浆蛋白提取　于培养的上皮细胞加入适量 RIPA 裂解液，4 ℃轻轻摇动 15 min，刮下粘附细胞，加 10 μl PMSF，冰上孵育 30 min，12 000 × g，4 ℃离心 10 min，上清液即为胞浆蛋白。

1.5.2 Western blot　按 Western blot 检测试剂盒说明书执行。一抗为 IκB-α 兔抗人多克隆抗体（终浓度 1 μg/ml），二抗为山羊抗兔 IgG（1∶400 稀释）。

1.6 EMSA 检测 NF-κB 活性

1.6.1 核蛋白提取　取约 10^7 个上皮细胞，冷 PBS 洗涤 1 次，加入 400 μl A 液（Hepes-NaOH 10 mmol/L，EGTA 0.05 mol/L，KCl 10 mmol/L，EDTA 0.1 mmol/L，$MgCl_2$ 1.5 mmol/L，PMSF 1 mmol/L，DTT 1 mmol/L，0.5% NP-40），冰浴 15～30 min，涡动 10 s，4 °C 12 000 × g 离心 5 min，取沉淀加入 B 液（Hepes-NaOH 20 mmol/L，EGTA 0.05 mol/L，EDTA 0.2 mmol/L，$MgCl_2$ 1.5 mmol/L，NaCl 0.42 mol/L，PMSF 1 mmol/L，DTT 1 mmol/L）冰浴 30 min，4 ℃ 12 000 × g 离心 5min，沉淀即为核蛋白。

1.6.2 EMSA 检测 NF-κB DNA 结合活性　按 EMSA 试剂盒说明书执行，主要包括：①探针变性、标记；②测定探针标记效率；③凝胶迁移反应；④聚丙烯酰胺凝胶电泳；⑤印迹及交联反应；⑥化学发光检测。NF-κB 通用探针序列：5′-AGTTGAGGG-GACTTTCCCAGGC-3′，3′-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5′。NF-κB 突变探针序列：5′-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3′，3′-TAAGCTAGCCCCGCCCCGCTCG-5′。

1.6.3 NF-κB 的超迁移率试验　在 DNA 核蛋白反应体系中，加入 2 μg 兔抗人 NF-κBp65、p50 抗体，于冰上孵育 30 min 后再加入标记探针，其余步骤同 EMSA。

1.7 图像分析

将各测量组的电泳照片及胶片用 EPSON Scaner 扫描至计算机，用图像分析方法测定电泳带的积分吸光度值（A）。

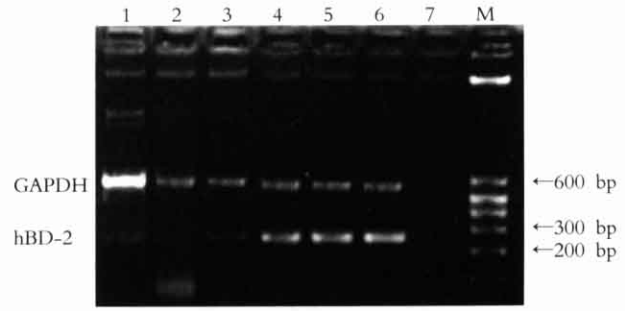
1.8 统计学分析

计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 软件进行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 TNF-α 刺激对 hBD-2 mRNA 表达的作用

本试验结果显示 TNF-α 10 ng/ml 刺激人气道上皮细胞 3 h 可见 hBD-2 mRNA 表达，在观察的 12 h 内表达逐步增加，并呈时间依赖性（图 1）。

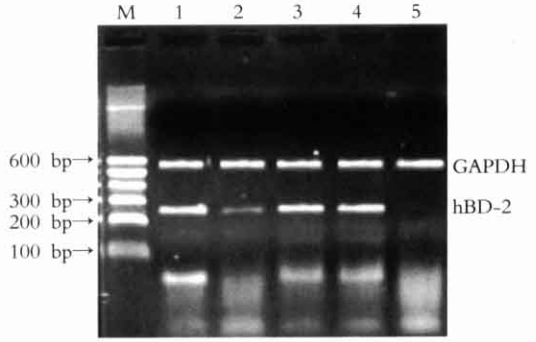


M：标准；1－6：分别为 TNF-α 刺激上皮细胞 0.5、1、2、3、6、12 h；7：阴性对照

图 1 hBD-2 mRNA 表达与 TNF-α 刺激时效关系

2.2 PDTC 对 hBD-2 mRNA 表达的影响

本试验显示用 PDTC 100 μmol/L 预处理 2 h 后，再用 TNF-α 10 ng/ml 刺激，可抑制人气道上皮细胞表达 hBD-2 mRNA（图 2）（与单用 TNF-α 刺激比较，$P < 0.01$）。

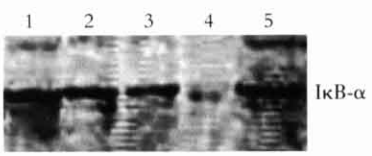


M：标准；1，3，4：TNF-α 刺激上皮细胞 6 h；2：PDTC 与 TNF-α 共同刺激 6 h；5：阴性对照

图 2 PDTC 对 IL-1β 刺激 hBD-2 表达的影响

2.3 上皮细胞质内 IκB-α 表达

动力学观察表明 TNF-α 刺激上皮细胞后，5 min 可见 IκB-α 减少，1 h 降到最低，而后逐渐恢复，至 2 h 可恢复至正常水平（图 3）。

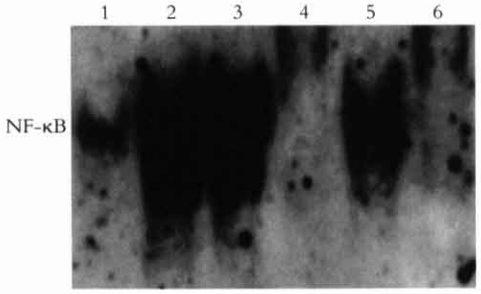


1－5：TNF-α 刺激上皮细胞 0、5、30、60、120 min IκB-α 的表达

图 3 TNF-α 刺激对上皮细胞 IκB-α 表达的影响

2.4　NF-κB 活性变化与 TNF-α 刺激的时效关系

用 10 ng/ml TNF-α 刺激人气道上皮细胞 0.5 h，NF-κB 即迅速出现活化，1 h 达到峰值后活性逐渐下降（图 4），各组 NF-κB 活性均较正常对照显著增强（$P<0.01$）。

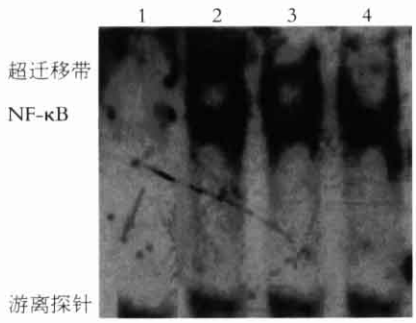


1,2,3,5：TNF-α 刺激上皮细胞 0、0.5、1、2 h；4,6：阴性对照

图 4　TNF-α 刺激不同时间 NF-κB 活性的变化

2.5　竞争抑制试验和抗体超迁移率试验

本试验结果显示，200 倍未标记的 NF-κB 寡核苷酸（冷探针）可竞争抑制 NF-κB 与探针的结合，而突变的 NF-κB 寡核苷酸不能竞争抑制 NF-κB 与探针的结合。抗体超迁移率试验结果显示加入 p50 抗体和 p65 抗体的有超迁移条带出现，提示 p50 和 p65 亚型参与了 NF-κB 的活化（图 5）。



1：200 倍未表记探针；2：NF-κB 抗 P65 抗体；3：NF-κB 抗-P50 抗体；4：突变探针

图 5　NF-κB 超迁移实验及竞争抑制试验

3　讨论

hBD-2 是黏膜和上皮细胞抵抗微生物入侵的重要介质，与人 β 防御素-1 在所有人气道中固有、持续表达不同，hBD-2 在肺里呈可诱导表达。

目前研究表明，hBD-2 的诱导表达可能是通过多信号途径实现的，其中 NF-κB 的作用较为明确和重要。Tomita 等[3]用人气道细胞株 LC2/ad 作对象，发现地塞米松、细胞内钙螯合剂可通过抑制 NF-κB 及 AP-1 的活化抑制 LPS 诱导的 hBD-2 表达。本研究显示 NF-κB 抑制剂 PDTC 可抑制 HBD-2 mRNA 表达，说明 NF-κB 是人气道上皮细胞 hBD-2 表达必需的转录因子。正常情况下，胞浆中 NF-κB 与 IκB 结合成复合物，功能处于抑制状态。本研究显示 NF-κB 在加入 TNF-α 后 0.5 h 迅速活化，1 h 达到峰值，此后活性逐渐下降，同时 IκB-α 在加入 TNF-α 后 5 min 可见减少，1 h降到最低，与同时 NF-κB 活化程度相一致，说明 NF-κB 的活化参与了 hBD-2 基因表达的转录。

但不同的细胞在不同的刺激因素作用下，被激活的 NF-κB 类型并不相同。Qgushi，Wada 等[4,5]分别在人肿瘤细胞 Caco-2 及胃癌细胞诱导表达 hBD-2 时证实是通过激活 NF-κB 的 p65 同型二聚体实现的；而 Tsutsumi 等[6]用肺泡Ⅱ型上皮细胞系 A549 作为研究对象诱导表达 hBD-2 时，发现 p65 与 p50 型 NF-κB 均参与上皮细胞系 A549 的 hBD-2 基因转录。国外 Jang 等[7]用 IL-1β 刺激上皮细胞系 A549 诱导 hBD-2 表达时发现 p65 型 NF-κB 参与基因转录；而 Kao 等[8]用 IL-17 刺激人原代气道上皮细胞发现抑制 P65 NF-κB 亚单位的激活可抑制 hBD-2 的表达，且 hBD-2 的表达是通过激活 p65 型 NF-κB 及 JAK 双信号通道实现的。本研究用人气道原代上皮细胞为研究对象，抗体超迁移试验结果显示异型二聚体 p65-p50 NF-κB 参与 hBD-2 诱导表达，与 Tsutsumi 等结论一致。但本研究仅研究了 NF-κB 是人气道上皮细胞表达 hBD-2 的必需的转录因子，还有无其他转录因子及信号通路参与 hBD-2 表达尚需进一步研究。

参考文献：

[1] SCHRODER J M, HARDER J. Human beta-defensin-2[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1999, 31(6): 645 - 651.

[2] 黄　宁，唐　彬，潘小玲，等. 人气管上皮细胞气液界面无血清培养[J]. 基础医学与临床，2000，20(2)：89 - 92.

[3] TOMITA T, NAGASE T, OHGA E, *et al*. Molecular mechanisms underlying human beta-defensin-2 gene expression in a human airway cell line (LC2/ad) [J]. Respirology, 2002, 7(4): 305 - 310.

[4] OGUSHI K, WADA A, NIIDOME T, *et al*. Salmonella enteritidis FliC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(32): 30521 - 30526.

[5] WADA A, OGUSHI K, KIMURA T, *et al*. Helicobacter pylori-mediated transcriptional regulation of the human beta-defensin 2 gene requires NF-kappaB[J]. Cell Microbiol, 2001, 3(2): 115 - 122.

[6] TSUTSUMI-ISHII Y, NAGAOKA I. Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production[J]. J Immunol, 2003, 170(8): 4226 - 4236.

[7] JANG B C, LIM K J, PAIK J H, *et al*. Up-regulation of human beta-defensin 2 by interleukin-1beta in A549 cells: involvement of PI3K, PKC, p38 MAPK, JNK, and NF-kappaB[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 320(3): 1026 - 1033.

[8] KAO C Y, CHEN Y, THAI P, *et al*. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium *via* JAK and NF-kappaB signaling pathways[J]. J Immunol, 2004, 173(5): 3482 - 3491.

（编辑　陈聪连）