文章编号:1000-5404(2009)14-1367-03

论著

白细胞介素-4对肺泡上皮细胞钠离子通道β亚基调控研究

张 维,王导新 (重庆医科大学附属第二医院呼吸内科,重庆 400010)

摘 要:目的 研究不同时间不同剂量白细胞介素-4(IL-4)作用下A549细胞钠离子通道β亚基(β-ENaC)的变化情况。**方法** 以A549细胞为模型,在含IL-4培养基不同时间不同剂量培养下,分别用免疫印迹法以及RT-PCR法测定β-ENaC蛋白表达以及mRNA变化转录情况。**结果** IL-4可以呈剂量、时间依赖性的下调β-ENaC的表达,这种蛋白表达的下调作用是通过基因调控起作用的。IL-4(1 ng/ml)培养A549细胞3 h,β-ENaC蛋白及mRNA开始下降,在6 h后出现显著差异($P<0.05$),不同剂量的IL-4(0.1、10、100 ng/ml)培养A549细胞12 h在0.1 ng/ml时即出现显著的差异($P<0.05$)。**结论** IL-4可通过下调β-ENaC的表达抑制肺泡水肿液清除能力,从而不利于急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征的预后。

关键词: 白细胞介素-4;钠离子通道β亚基;急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征
中图法分类号: R322.35;R329.27;R392.11 **文献标识码:** A

Interleukin-4 decreases expression of epithelial sodium channel β-subunit in A549 cells

ZHANG Wei, WANG Dao-xin (Department of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the effects of IL-4 on the expression of epithelial sodium channel (ENaC) β-subunit. **Methods** A549 cells were cultured with IL-4 at the concentration of 0, 0.1, 1 and 10 ng/ml for 12 h or with 1 ng/ml IL-4 for 3, 6, 12, 24 and 48 h. Then β-ENaC protein and mRNA expressions were detected by Western blotting and RT-PCR respectively. **Results** IL-4 decreased the expression of β-ENaC in A549 cells in a time- and dose-dependent manner, *via* gene transformation. When A549 cells were cultured with IL-4 at the concentration of 1 ng/ml for 3, 6, 12, 24 and 48 h, the expression of β-ENaC protein and mRNA were decreased in a time-dependent manner. Statistical analysis showed culture for 6 h had a significant difference compared with other time points ($P<0.05$). When cells were cultured with different concentration of 0, 0.1, 1and 10 ng/ml for 12 h, the β-ENaC protein and mRNA showed a dose-dependent manner. Concentration at 0.1 ng/ml showed a significant difference among other concentration. **Conclusion** IL-4 was usually regarded as a anti-inflammatory factor and have a protection in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. But in this experiment it seems have a different role in the disease. IL-4 can decreases the expression of β-ENaC, and down-regulate the active alveolar fluid clearance, which may make the outcome worse.

Key words: IL-4; epithelial sodium channel β-subunit; acute lung injury/acute respiratory distress syndrome

富含蛋白质的肺泡水肿液聚集是急性肺损伤(acute lung injury, ALI)和急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)的共同的病理特征。是否能有效清除肺泡内过多液体,维持肺泡腔内相对干燥的环境,对于有效的气体交换具有十分重要的意义,并且在一定程度上决定了病情的转归[1]。上皮细胞钠离子通道(epithelial sodium channel, ENaC)是肺泡水肿液清除发挥作用的重要限速环节。ENaC由α、β、γ 3种亚基组成,3种亚基的不同组合所形成的通道具有不同的单位电导和调节特性[2]。胎儿及

作者简介:张 维,男,陕西省汉中市人,硕士研究生,主要从事肺部重症疾病方面的研究。E-mail:weiowei_0@yahoo.com.cn
通信作者:王导新,E-mail:wangdaoxin1@163.com.cn
收稿日期:2008-09-02;修回日期:2008-10-21

成人肺泡上皮细胞上,α-亚基和 γ-亚基含量相对丰富,而 β-亚基含量很低,但是可以在某些激素如地塞米松的刺激下增加,使膜上原有的单纯 α-ENaC 组成或 α-和 γ-ENaC 二者组成的通道变成 3 个亚基共同组成的高选择性的通道,从而增加通道的活性,由此可认为 β-ENaC 可能是通道形成以及插入膜表面的限速亚基[3]。β 亚基基因敲除的小鼠其肺泡水肿液的清除速率下降,这些小鼠最终死于因肾脏重吸收障碍导致的高钾血症[4],所以对肺泡上皮细胞的钠离子通道 β 亚基的影响因子研究对于 ALI/ARDS 发展中的肺水肿液聚集及清除是有重要意义的。在 ALI/ARDS 机制研究中一直都认为 IL-4 是一种保护性的细胞因子,迄今少见 IL-4 对肺泡上皮细胞的 ENaC 基因表达影响的研究,亦没有阐明具体的机制。本实验以 A549 细胞为模型,研究在 IL-4 作用下肺泡Ⅱ型上皮细胞 β-ENaC 亚基的基因表达情况。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

本实验采用具有肺泡Ⅱ型上皮细胞的生物学特性,国内外肺泡上皮细胞研究常用的 A549 细胞作为实验模型,细胞来源于重庆医科大学病毒性肝炎研究所,用含 10% 新生小牛血清(购自四季青公司)的 1640 培养基在 37 ℃、5% CO_2孵箱培养。胰蛋白酶消化传代,分别采用含有人重组 IL-4(购自 Peprotech Asia 公司)1 ng/ml,含 10% 新生小牛血清的 1640 培养基培养 3、6、12、24、48 h,以不含有 IL-4 的培养基培养作为参照,提取蛋白(膜蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物制品公司)及 RNA(RNA 提取试剂盒购自大连宝生物工程有限公司)。再将细胞按不同剂量 IL-4 处理(0、0.1、1、10 ng/ml,培养 12 h),提取膜蛋白及 RNA。Western blot 测定蛋白表达变化,RT-PCR 测定基因转录情况。

1.2 Western blot 检测

将提取到的蛋白进行蛋白定量(采用 BCA 法),绘制标准蛋白曲线,定量后的蛋白按 Western blot 法要求稀释于上样缓冲液中于 100 ℃煮沸 5 min, -80 ℃保存。选择 β-actin 作为内参(购自精美生物公司),标准(购自 Fermentas Life sciences 公司)、β-ENaC 抗体(购自 Abcam 公司)终结果采用 DAB 显色,图像扫描后半定量分析。

1.3 RT-PCR 检测

提取的总 mRNA 按照 β-ENaC 基因序列设计引物,由上海宝生物公司合成。β-ENaC 上游:5′-CAACACGACCTACTCCATCC-3′,下游:5′-AGACGTGGAAAATCCAGTCC-3′,产物大小为 2 597 bp;内参 β-actin 上游:5′-ATTGCCGACAGGATGCAGA-3′,下游:5′-GAGTACTTGCGCTCAGGAGGA-3′,产物大小为 621 bp。PCR 扩增产物紫外分光光度计定量。由标准曲线计算样本初始拷贝数及 β-ENaC/β-actin 值,定量分析结果。采用 Quantity One 软件对 Western blot、RT-PCR 检测结果进行图像分析。

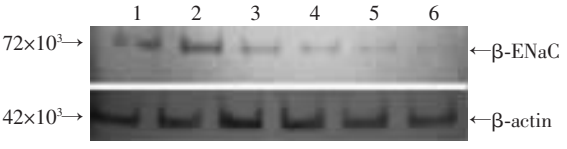
1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 IL-4 不同作用时间对 β-ENaC 蛋白表达的影响

含相同剂量的 IL-4(1 ng/ml)的细胞培养基培养 A549 细胞 3、6、12、24、48 h 后提取蛋白,免疫印迹检测显示 β-ENaC 蛋白表达随 IL-4 作用时间的延长而下降(图 1)。若以未添加 IL-4 培养的 A549 细胞的蛋白表达量为 100%,则 3 h 时表达量为 98.23%,6 h 为 92.46%,12 h 为 85.12%,24 h 为 72.12%,48 h 为 50.1%。统计学分析 IL-4 在作用 6 h 后出现明显差异的下调效应,并随作用时间的延长呈持续的下调作用,两者之间呈显著负相关($r = -0.996$, $P < 0.05$)。

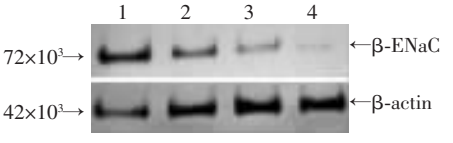


1:0 h;2:3 h;3:6 h;4:12 h;5:24 h;6:48 h

图 1 Western blot 检测 1 ng/ml IL-4 培养不同时间对 β-ENaC 表达的影响

2.2 IL-4 不同剂量对 β-ENaC 蛋白表达的影响

用含有不同剂量的 IL-4(0.1、1、10 ng/ml)培养基培养 A549 细胞 12 h 后免疫印迹测定蛋白含量结果显示,随 IL-4 剂量的增加 β-ENaC 表达量呈下降趋势(图 2)。若以 0 ng/ml 时蛋白表达量为 100%,则 0.1 ng/ml 时为 90.25%,1 ng/ml 时为 86.21%,10 ng/ml 时为 56.69%,统计学分析各剂量变化存在统计学差异($P < 0.05$),两者之间呈明显的负相关($r = -0.969$)。

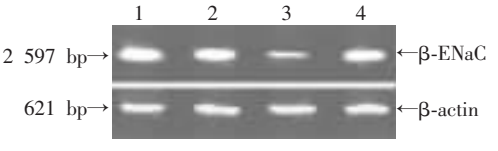


1:0 ng/ml;2:0.1 ng/ml;3:1 ng/ml;4:10 ng/ml

图 2 Western blot 检测不同剂量 IL-4 培养对 β-ENaC 表达的影响

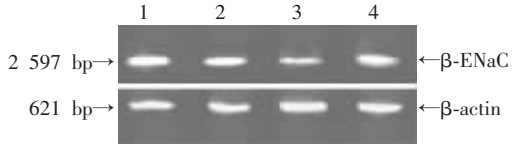
2.3 IL-4 对 β-ENaC mRNA 拷贝的影响

通过 Quantity One 软件分析 RT-PCR 检测结果证实 β-ENaC mRNA 拷贝变化与 β-ENaC 蛋白表达变化趋势一致(图 3、4)。



1:6 h;2:12 h;3:24 h;4:0 h

图 3 RT-PCR 检测 1 ng/ml IL-4 培养不同时间对 β-ENaC 基因转录的影响



1：0.1 ng/ml；2：1 ng/ml；3：10 ng/ml；4：0 ng/ml

图 4　RT-PCR 检测不同剂量 IL-4 培养对 β-ENaC 基因转录的影响

3　讨论

ALI/ARDS 是严重危害人类健康的疾病,迄今其机制仍然不清楚。肺泡内过多液体的聚集是它的基础病理生理学变化之一,能否有效清除肺泡内多余液体保持肺泡腔内相对干燥的环境直接关乎患者的呼吸功能的改善和预后。现今已经有通过物理的压缩肺泡排液[5],药物如 β 受体激动剂[6],基因治疗以及水通道蛋白[7]等方面的探索,通过提高肺泡水肿液的清除能力来改善 ALI/ARDS 的预后并取得了一定的成果。Matthay 认为这一方面的研究结果有可能用于改善由 ALI/ARDS、肺部感染导致的肺泡内液体积聚引起的呼吸衰竭的预后[8]。这些研究都是对肺泡水肿液形成以及清除机制的进一步认识。

IL-4 对于 B 细胞、T 细胞、肥大细胞、巨噬细胞有免疫调节作用。体内、体外实验均证实 IL-4 可以抑制前炎症因子 IL-1、TNF 分泌,因此一直以来都被认为是在 ALI/ARDS 发病过程中的一种保护性抗炎因子,但是其具体的机制不清楚,也少见该因子在 ALI/ARDS 发生发展机制中的研究。2002 年 Galietta 等[9]在哮喘的发病机制研究中发现 IL-4 可以下调气道上皮 ENaC 功能,这种作用是通过对其各亚基的基因转录下调实现的[9],但其具体的信号转导机制仍然不清楚。为了说明 IL-4 在 ALI/ARDS 肺泡水肿液清除中的作用我们设计了本实验。A549 细胞具有Ⅱ型肺泡上皮细胞特性,因此实验以 A549 细胞株为干预模型探讨了 IL-4 不同时间不同剂量作用下钠离子通道 β 亚基蛋白的表达情况。

本实验结果表明 IL-4 可以呈时间剂量依赖性的下调钠离子通道蛋白 β 亚基蛋白的表达,随着时间和剂量的增加,β 亚基表达呈下降的趋势并与影响因素呈负相关,分别在 6 h 和 1 ng/ml 时出现统计学差异。同时通过 RT-PCR 法验证了 IL-4 对 β-ENaC 基因转录的抑制说明引起这种蛋白下调的作用是通过影响其基因的转录起作用的,趋势与 Western blot 检测结果一致。因此本实验结果可以认为 IL-4 可以呈时间剂量依赖性的下调 β-ENaC 的表达。这种作用是通过对基因转录的抑制起作用的。如前所述该亚基在研究中被证明可能是肺水肿液清除作用中的限速亚基,肺泡上皮细胞的 β-ENaC 低表达可以降低小鼠肺损伤模型的肺水肿液清除能力[10],因此 IL-4 对 β-ENaC 表达的抑制作用可能不利于 ALI/ARDS 时造成的肺泡内富含蛋白质的水肿液的清除和肺泡内气体交换环境的维持,而这正是 ALI/ARDS 产生低氧血症和呼吸窘迫的原因。所以从肺水肿液清除的角度来说,IL-4 这种细胞因子不利于 ALI/ARDS 的预后。

该实验的结果有待于在体内实验进一步验证,并通过对该因子作用机制的进一步研究了解引起钠离子通道亚基表达的具体信号转导通路,从而更深入的认识 ALI/ARDS 的发病机制,而通过对 IL-4 这种作用的干预可能对 ALI/ARDS 的预后有积极意义。

参考文献：

[1] Sartori C, Matthay M A. Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights [J]. Eur Respir J, 2002, 20(5): 1299 - 1313.

[2] Canessa C M, Schild L, Buell G, *et al*. Amiloride-sensitive epithelial Na^+ channel is made of three homologous subunits[J]. Nature, 1994, 367(6462): 463 - 467.

[3] McDonald F J, Yang B, Hrstka R F, *et al*. Disruption of the beta subunit of the epithelial Na^+ channel in mice: hyperkalemia and neonatal death associated with a pseudohypoaldosteronism phenotype[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(4): 1727 - 1731.

[4] Rafii B, Tanswell A K, Otulakowski G, *et al*. O_2-induced ENaC expression is associated with NF-kappaB activation and blocked by superoxide scavenger [J]. Am J Physiol, 1998, 275(4 Pt 1): L764 - L770.

[5] 王导新, 张　玲, 王智彪, 等. 压缩肺排肺泡液术与控制性肺膨张术对中、重度 ARDS 模型 beagle 犬的实验研究[J]. 重庆医科大学学报, 2005, 30(6): 799 - 802.

[6] Sakuma T, Tuchihara C, Ishigaki M, *et al*. Beta1-adrenoceptor stimulation by high-dose terbutaline downregulates terbutaline-stimulated alveolar fluid clearance *in ex vivo* rat lung[J]. Exp Lung Res, 2001, 27(5): 453 - 468.

[7] 周长喜, 钱桂生, 杨　昱, 等. 海水淹溺肺损伤大鼠肺组织水通道蛋白 1 表达变化的研究[J]. 中国急救医学, 2008, 28(4): 325 - 327.

[8] Matthay M A. Resolution of pulmonary edema[J]. Sci Med, 2003, 9(1): 12 - 22.

[9] Galietta L J, Pagesy P, Folli C, *et al*. IL-4 is a potent modulator of ion transport in the human bronchial epithelium *in vitro* [J]. J Immunol, 2002, 168(2): 839 - 845.

[10] Randrianarison N, Clerici C, Ferreira C, *et al*. Low expression of the beta-ENaC subunit impairs lung fluid clearance in the mouse[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 294(3): L409 - L416.

（编辑　张　维）