论著

文章编号:1000-5404(2010)09-0900-04

# 乌司他丁对TNF-α作用的A549细胞ENaC-β mRNA和蛋白表达的影响

邓 嘉,李长毅,王导新 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院呼吸内科)

**[摘要]** **目的** 通过研究乌司他丁对TNF-α作用的A549细胞ENaC-β转录和翻译水平的影响。**方法** 将A549细胞分组为空白组、乌司他丁组、TNF-α组和乌司他丁+TNF-α组,TNF-α浓度为100 ng/ml,各组作用时间均为6、12、24 h。乌司他丁组及乌司他丁+TNF-α组在12 h时间点上分别用1 250、2 500、5 000 U/ml 3种浓度乌司他丁作用A549细胞,采用浓度5 000 U/ml乌司他丁分别作用6、24 h,RT-PCR半定量检测ENaC-β mRNA表达量,Western blot半定量检测ENaC-β蛋白浓度。**结果** ①在作用不同时间后,乌司他丁对ENaC-β mRNA和蛋白表达水平的影响与空白组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。②5 000 U/ml乌司他丁+TNF-α组分别作用6、12、24 h后ENaC-β mRNA及蛋白表达较TNF-α组均明显升高($P<0.01$)。③作用12 h后,各浓度乌司他丁+TNF-α组ENaC-β mRNA及蛋白表达较TNF-α组均明显升高($P<0.01$),且各浓度组间ENaC-β mRNA及蛋白表达差异也有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 乌司他丁不能直接上调A549细胞ENaC-β转录和翻译水平,但能以浓度依赖方式对抗炎症反应对ENaC-β表达的抑制作用。

**[关键词]** 乌司他丁;上皮钠通道;急性肺损伤;肿瘤坏死因子-α

**[中图法分类号]** R322.35; R392.2; R977.6 **[文献标志码]** A

# Effect of ulinastatin on expression of ENaC-β mRNA and protein in A549 cells treated with TNF-α

Deng Jia, Li Changyi, Wang Daoxin (Department of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of ulinastatin on transcript and translation of ENaC-β mRNA and protein of human alveolar epithelial A549 cells treated with TNF-α and its mechanism of action in treatment of acute respiratory distress syndrome. **Methods** A549 cells were divided into normal control group, ulinastatin group, TNF-α group and ulinastatin + TNF-α group. TNF-α concentration was 100 ng/ml. A549 cells in each group were treated with ulinastatin, TNF-α or ulinastatin + TNF-α for 6, 12 and 24 h, respectively. A549 cells in ulinastatin and ulinastatin + TNF-α groups were treated with ulinastatin at the concentration of 1 250, 2 500 and 5 000 U/ml for 12 h, and then at the concentration of 5 000 U/ml for 6 and 24 h, respectively. ENaC-β mRNA and protein expression levels were measured by semi-quantitative RT-PCR and Western blotting. **Results** No significant difference was found in effect of ulinastatin on ENaC-β mRNA and protein expression level in A549 cells in 6, 12 and 24 h after treatment with it between treatment group and control group($P>0.05$). The ENaC-β mRNA and protein expression level in A549 cells in 6, 12 and 24 h after treatment with ulinastatin (at the concentration of 5 000 U/ml) + TNF-α was significantly increased compared with that after treatment with TNF-α ($P<0.01$). However, it was significantly different 12 h after treatment with different concentrations of ulinastatin + TNF-α from that after treatment with TNF-α alone($P<0.01$). The ENaC-β mRNA and protein expression level was different at different time points after treatment with different concentrations of ulinastatin + TNF-α($P<0.05$). **Conclusion** Ulinastatin can not directly up-regulate the transcription and translation of ENaC-β in A549 cells, but can reverse the inhibitory effect of inflammatory response on ENaC-β expression in a concentration-dependent manner.

**[Key words]** ulinastatin; epithelial sodium channel; acute lung injury; tumor necrosis factor-α

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30971303). Corresponding author: Wang Daoxin, Tel:86-23-63693094, E-mail: wangdaoxin1@163.com

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30971303)

**[通信作者]** 王导新,电话:(023)63693094,E-mail:wangdaoxin1@163.com

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)以肺部炎症、肺毛细血管通透性增

加、肺水肿形成为特征。肺泡内液体能否清除是治疗ARDS的关键。目前研究认为肺泡内液体清除的主要机制是通过肺泡上皮细胞的上皮钠通道(epithelial sodium channel, ENaC)完成从顶膜到基底膜侧的主动钠离子转运[1],ENaC表达或功能缺陷将导致肺水肿及其清除障碍[2]。乌司他丁在急性肺损伤中可以下调促炎性细胞因子及粘附分子的表达,并通过抑制多种炎性介质影响中性白细胞的趋化聚集和激活[3,4],达到抑制中性白细胞浸润和减轻肺水肿的作用。但有关乌司他丁缓解肺水肿的机制是否与ENaC相关的研究尚少。本实验在人Ⅱ型肺泡上皮A549细胞暴露于TNF-α后,观察乌司他丁对ENaC-β mRNA和蛋白表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

A549细胞系由本实验室保存,TNF-α购自美国Sigma公司,总RNA抽提试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,第一链cDNA合成试剂盒和PCR试剂盒购自美国Fermentas(MBI)公司,ENaC-β及β-actin单克隆抗体购自美国Abcam公司,ECL化学发光试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司,乌司他丁购自广东天普生化医药股份有限公司。

### 1.2 细胞培养

人Ⅱ型肺泡上皮A549细胞培养于含10% FBS的RPMI1640培养基中,放置入37 ℃、5% $CO_2$、饱和湿度培养箱。每2~3天收集对数期生长细胞,以细胞数$2\times10^4$/ml分瓶培养。

### 1.3 方法

1.3.1 细胞活性测定 将细胞接种于96孔培养板中,调整每孔细胞数为$1\times10^4$,完全培养基培养24 h后换无血清培养液培养24 h,各孔分别加入浓度为1 250、2 500、5 000、7 500、10 000 U/ml的乌司他丁,作用24 h后进行甲基偶氮唑盐(MTT)法测定。酶标读数仪上用492 nm波长测定各孔光密度值[$D(492)$],以不加乌司他丁而只有等量二甲基亚砜的孔为阴性对照,仅加培养液孔为空白对照。各实验组安排3个复孔,取平均值,计算细胞存活率。实验重复3次,结果基本一致,根据其中一次实验值绘制细胞生存图。

细胞存活率=[实验组$D(492)$值-空白对照组$D(492)$值]/[阴性对照组$D(492)$值-空白对照组$D(492)$值]×100%

1.3.2 细胞处理及分组 待细胞生长至约75%汇合度时,弃培养基,用冷的PBS冲洗2次,以不含FBS的RPMI1640培养基为对照,用不含FBS的RPMI1640培养基稀释TNF-α浓度为100 ng/ml,以及1 250、2 500、5 000、7 500、10 000 U/ml的乌司他丁溶液。细胞活性测定结果提示7 500、10 000 U/ml乌司他丁溶液对A549细胞损伤明显,故在本实验中未予采纳。实验分组:①空白组:无血清RPMI1640培养;②乌司他丁组:向所培养细胞中直接加入乌司他丁,在6 h和24 h浓度为5 000 U/ml,在12 h分为1 200、2 500、5 000 U/ml;③TNF-α组:浓度为100 ng/ml,作用时间分别为6、12、24 h;④乌司他丁+TNF-α组:向所培养细胞中同时加入乌司他丁和TNF-α,TNF-α浓度为100 ng/ml,作用时间分别为6、12、24 h,乌司他丁在6 h和24 h浓度为5 000 U/ml,在12 h分为1 200、2 500、5 000 U/ml。收集各组细胞用以提取总RNA和蛋白。实验重复3次。

1.3.3 RT-PCR检测 总RNA抽提试剂盒提取A549细胞总RNA,具体操作按说明书进行。以2 μg总RNA为模板,用Oligo(dT)18为引物,按照说明书介绍的方法合成cDNA第1链。ENaC-β引物:正义链:5′-TTGTCTCAGGAGCGGGACCA-3′,反义链:5′-GCTGGAAGCCAAAGTTGGTG-3′,片段长度354 bp;β-actin引物:正义链:5′-CATGAAGATCCTCACCGAGC-3′,反义链:5′-GTGGACATCCGCAAAGACCT-3′,片段长度290 bp,由上海生工合成。PCR反应体系如下:2 μl逆转录产物模板、PCR Master Mix(2×) 25 μl、正反引物各2 μl,以超纯水补充至50 μl。PCR反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,62 ℃(ENaC-β)和57 ℃(β-actin) 60 s,72 ℃ 60 s,循环35轮,最后72 ℃延伸10 min。PCR产物8 μl与5×loading buffer 2 μl混匀后,1.2%琼脂糖凝胶20 V/cm电压进行电泳约30 min。应用凝胶成像系统(Bio-Rad)摄影,Quantity One软件对目的条带进行扫描,计算各产物条带的密度-面积乘积,以此定量条带的灰度。同一标本ENaC-β PCR产物条带扫描量与β-actin PCR产物条带扫描量的比值,为ENaC-β mRNA在A549细胞中的相对表达量。

1.3.4 Western blot检测 用三去污裂解液裂解A549细胞提取总蛋白,每泳道加35 μg总蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳,运用湿转法转移至硝酸纤维素滤膜上,在脱色摇床上用脱脂奶粉摇动封闭1 h后,分别加入ENaC-β兔抗人多克隆抗体(1∶1 000)及β-actin兔抗人多克隆抗体(1∶2 000),4 ℃孵育过夜,洗膜后加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶1 000),ECL增强化学发光显色系统显色,每组实验至少重复3次。用凝胶成像分析系统进行扫描,以ENaC-β/β-actin条带光密度比值作为ENaC-β蛋白表达的相对含量。

### 1.4 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,两样本均数间采用$t$检验,多个样本间比较用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 细胞活性测定结果

乌司他丁浓度为1 250、2 500、5 000 U/ml时,细胞生存率分别为(99.3±0.5)%、(93.5±0.9)%、(82.2±0.3)%,说明乌司他丁作用浓度在5 000 U/ml以下时对细胞的损伤不明显。

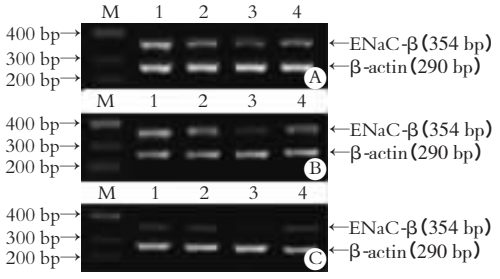
### 2.2 乌司他丁对TNF-α作用的ENaC-β表达的影响

空白组与乌司他丁组的ENaC-β mRNA及蛋白表达在各个时间点上差异都无统计学意义($P>0.05$)。A549细胞在TNF-α作用后,在6、12、24 h各时间点ENaC-β mRNA及蛋白表达较空白组均显著下降($P<0.01$)。TNF-α+乌司他丁组在各个时间点上,ENaC-β mRNA及蛋白表达较TNF-α组均明显升高($P<0.01$)。TNF-α+乌司他丁组与空白组ENaC-β mRNA及蛋白表达有显著差异($P<0.05$)。见表1,图1、2。

**表1 乌司他丁对 TNF-α 作用的 ENaC-β mRNA 及蛋白表达的影响**（$\bar{x} \pm s$）

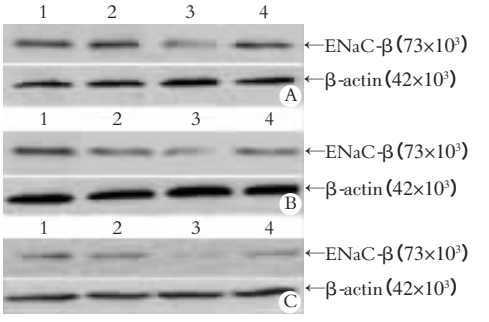
| 组别 | ENaC-β/β-actin mRNA | | | ENaC-β/β-actin 蛋白 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 6 h | 12 h | 24 h | 6 h | 12 h | 24 h |
| 空白组 | 0.520 ± 0.036 | 0.527 ± 0.025 | 0.560 ± 0.020 | 0.808 ± 0.070 | 0.813 ± 0.011 | 0.687 ± 0.015 |
| 5 000 U/ml 乌司他丁组 | 0.510 ± 0.010 | 0.513 ± 0.035 | 0.537 ± 0.031 | 0.807 ± 0.021 | 0.817 ± 0.022 | 0.687 ± 0.032 |
| TNF-α 组 | 0.310 ± 0.020[a] | 0.243 ± 0.031[a] | 0.207 ± 0.021[a] | 0.567 ± 0.038[a] | 0.510 ± 0.017[a] | 0.327 ± 0.025[a] |
| TNF-α + 5 000 U/ml 乌司他丁组 | 0.453 ± 0.032[bc] | 0.453 ± 0.025[bc] | 0.500 ± 0.020[bc] | 0.724 ± 0.021[bc] | 0.770 ± 0.026[bc] | 0.633 ± 0.019[bc] |

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与空白组比较；c：$P<0.01$，与 TNF-α 组比较




A：6 h；B：12 h；C：24 h；M：DNA 标准；1：空白组；2：5 000 U/ml 乌司他丁组；3：TNF-α 组；4：TNF-α + 5 000 U/ml 乌司他丁组

**图1 RT-PCR 检测乌司他丁对 TNF-α 作用的 ENaC-β mRNA 表达的影响**




A：6 h；B：12 h；C：24 h；1：空白组；2：5 000 U/ml 乌司他丁组；3：TNF-α 组；4：TNF-α + 5 000 U/ml 乌司他丁组

**图2 Western blot 检测乌司他丁对 TNF-α 作用的 ENaC-β 蛋白表达的影响**

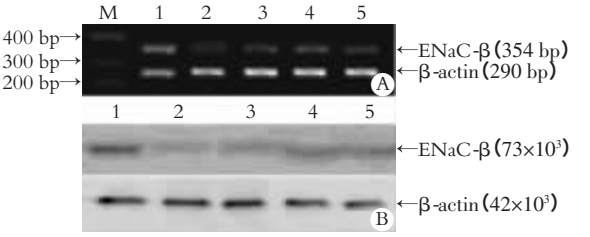
### 2.3 乌司他丁浓度对 ENaC-β 表达的影响

12 h 各浓度组 ENaC-β mRNA 及蛋白表达与 TNF-α 组相比显著增强（$P<0.01$）；各浓度组之间比较，ENaC-β mRNA 及蛋白表达呈乌司他丁浓度依赖，随药物浓度的增加，其 mRNA 及蛋白表达也显著增强（$P<0.05$）。各浓度组 ENaC-β mRNA 及蛋白表达与空白组相比差异均有统计学意义（$P<0.01$）。见表2和图3。

**表2 不同浓度乌司他丁对 ENaC-β 表达的影响**（$\bar{x} \pm s$）

| 组别 | ENaC-β/β-actin mRNA | ENaC-β/β-actin 蛋白 |
|---|---|---|
| 空白组 | 0.527 ± 0.025 | 0.813 ± 0.011 |
| TNF-α 组 | 0.243 ± 0.031 | 0.510 ± 0.017 |
| TNF-α + 1 250 U/ml 乌司他丁组 | 0.340 ± 0.036[a] | 0.550 ± 0.030 |
| TNF-α + 2 500 U/ml 乌司他丁组 | 0.400 ± 0.021[ab] | 0.607 ± 0.012[ab] |
| TNF-α + 5 000 U/ml 乌司他丁组 | 0.453 ± 0.025[ac] | 0.770 ± 0.026[ac] |

a：$P<0.01$，与 TNF-α 组比较；b：$P<0.05$，与 TNF-α + 1 250 U/ml 乌司他丁组比较；c：$P<0.01$，与 TNF-α + 2 500 U/ml 乌司他丁组比较




A：RT-PCR 检测 ENaC-β mRNA 表达　M：DNA 标准；1：空白组；2：TNF-α 组；3：TNF-α + 1 250 U/ml 乌司他丁组；4：TNF-α + 2 500 U/ml 乌司他丁组；5：TNF-α + 5 000 U/ml 乌司他丁组

B：Western blot 检测 ENaC-β 蛋白表达　1：空白组；2：TNF-α 组；3：TNF-α + 1 250 U/ml 乌司他丁组；4：TNF-α + 2 500 U/ml 乌司他丁组；5：TNF-α + 5 000 U/ml 乌司他丁组

**图3 不同浓度乌司他丁对 ENaC-β mRNA 和蛋白表达的影响**

## 3 讨论

尽管从20世纪认识 ARDS 以来，对其进行了基础和临床的研究工作，但它目前仍然是一种灾难性的疾病，其具体机制仍不十分清楚。但是炎症理论在其发病机制中的重要作用已得到共识和大量研究结果的证实，认为 ARDS 是炎症反应的结果[5,6]，肺上皮屏障结构及功能障碍是导致肺损伤、肺水肿的主要原因[7]。炎性介质能够抑制 ENaC 的表达，降低肺泡内离子和液体的转移，加重肺水肿[8]；而逆转炎症作用，上调 ENaC 表达，则有利于控制肺水肿，减轻肺损伤[9]。用 beta-Liddle 变异小鼠持续高度活化 ENaC，使肺泡水肿液清除明显增加，显著改善肺毛细血管外渗出，减轻疾病的严重程度[10]。在本实验中，与空白组相比，炎性介质 TNF-α 明显抑制 A549 细胞 ENaC-β mRNA 和蛋白表达，与上述相关研究结果一致，说明炎性介质无论在转录或是翻译水平对 ENaC 的表达都具有抑制作用，不利于肺水肿的清除。

ENaC 由 α、β、γ 3 种亚基组成[11]，以小鼠为实验对象，β 亚基的低表达会导致基础肺泡液体清除（alveolar fluid clearance，AFC）功能损害以及降低 AFC 对阿米洛利的敏感性，即使存在代偿性 α 亚基表达量增加，但仍然难以提高液体的重吸收，并且减弱 β 受体激动剂对 AFC 的刺激作用[12]；多种药物或分子影响 ENaC 活性都与 β 亚基有密切关系[13]，因而认为 β 亚

基可调节通道活性，是通道形成以及插入膜表面的限速亚基，对维持 ENaC 功能有重要作用，这也是本实验选取 ENaC-β 为研究对象的主要原因。

大量研究结果显示乌司他丁对肺有保护作用，认为其可能的机制包括：乌司他丁对中性白细胞的直接抑制作用，抑制中性白细胞在肺组织的聚集，对脂质过氧化代谢产物的抑制，对内皮素的抑制等作用[14]；此外，乌司他丁还具有清除 NO、下调 NO 合酶和血红素氧化酶-1（hemo oxygenase-1，HO-1）的生成等抗氧化作用[15]。水通道蛋白与 ENaC 在肺内同样发挥着促进肺液清除的作用，乌司他丁能够有效上调 ALI 组织中水通道蛋白-1、4 的表达[16]。本实验在炎性介质 TNF-α 抑制 ENaC-β 表达的基础上给予乌司他丁干预，发现乌司他丁能够在各个时间点上逆转 TNF-α 对 ENaC-β 表达的抑制作用，并且呈剂量-效应依赖关系，提示乌司他丁在 ARDS 治疗中具有促进肺液清除的作用，与陆卫华等[17]有关乌司他丁能抑制 ALI 家兔肺组织肺水含量及减轻肺水肿的研究结果一致。同时在本实验中，直接用乌司他丁作用 A549 细胞后，其 ENaC-β 转录及翻译水平与空白组相比无显著差异，说明乌司他丁并不能直接上调 A549 细胞的 ENaC-β mRNA 及蛋白表达。可能原因：乌司他丁属于丝氨酸蛋白酶抑制物，它能够抑制如胰蛋白酶等丝氨酸蛋白酶[18]。丝氨酸蛋白酶及其抑制物对上皮钠通道的作用主要是影响 ENaC 亚基在膜上的剪切修饰和钠通道自身特性如钠离子短循环流（short circuit current，$I_{sc}$）、通道开放率[19]等，不引起相关蛋白在膜上表达丰度的变化，因而对 ENaC-β 蛋白的表达无明显作用，这与 Adebamiro 等[20]的研究结果是相符的。再者，蛋白酶及其抑制物的作用对象是针对蛋白，而不在转录水平上，所以蛋白酶及其抑制物对 ENaC 的研究也定位于蛋白水平。因此，可以认为在本实验中，乌司他丁发挥的主要作用是对抗炎症反应的抑制作用，对 ENaC-β 转录和翻译水平的上调是抗炎效能下的间接作用所致。

## 参考文献：

[1] 钱桂生，王建春. 急性呼吸窘迫综合征研究进展[J]. 第三军医大学学报，2004，26(10)：843－844.

[2] Egli M，Duplain H，Lepori M，*et al*. Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice[J]. J Physiol，2004，560(Pt 3)：857－865.

[3] Inoue K，Takano H，Yanagisawa R，*et al*. Protective role of urinary trypsin inhibitor in acute lung injury induced by lipopolysaccharide [J]. Exp Biol Med (Maywood)，2005，230(4)：281－287.

[4] Ito K，Mizutani A，Kira S，*et al*. Effect of Ulinastatin，a human urinary trypsin inhibitor，on the oleic acid-induced acute lung injury in rats *via* the inhibition of activated leukocytes[J]. Injury，2005，36(3)：387－394.

[5] Roux J，Kawakatsu H，Gartland B，*et al*. Interleukin-1beta decreases expression of the epithelial sodium channel alpha-subunit in alveolar epithelial cells *via* a p38 MAPK-dependent signaling pathway[J]. J Biol Chem，2005，280(19)：18579－18589.

[6] 邹显巍，吴珊. 大鼠脑出血后脑肺组织 NF-κB 的表达及其在急性肺损伤中的作用[J]. 第三军医大学学报，2007，29(19)：1859－1862.

[7] 陶军，杨天德，陈祥瑞. 肺上皮屏障在油酸致肺损伤后肺水肿发生中的作用[J]. 第三军医大学学报，2006，28(3)：212－214.

[8] Eisenhut M. Reduction of alveolar epithelial ion and fluid transport by inflammatory mediators[J]. Am J Respir Cell Mol Biol，2007，36(3)：388－389.

[9] Dagenais A，Frechette R，Clermont M E，*et al*. Dexamethasone inhibits the action of TNF on ENaC expression and activity[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol，2006，291(6)：L1220－L1231.

[10] Randrianarison N，Escoubet B，Ferreira C，*et al*. beta-Liddle mutation of the epithelial sodium channel increases alveolar fluid clearance and reduces the severity of hydrostatic pulmonary oedema in mice[J]. J Physiol，2007，582(Pt 2)：777－788.

[11] Staruschenko A，Adams E，Booth R E，*et al*. Epithelial Na channel subunit stoichiometry[J]. Biopbys，2005，88(6)：3966－3975.

[12] 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.

[13] Ma H P，Chou C F，Wei S P，*et al*. Regulation of the epithelial sodium channel by phosphatidylinositides：experiments，implications，and speculations[J]. Pflugers Arch，2007，455(1)：169－180.

[14] 车丽燕，李永春. 乌司他丁治疗急性肺损伤的研究进展[J]. 实用药物与临床，2006，9(5)：322－324.

[15] Inoue K，Takano H，Yanagisawa R，*et al*. Antioxidative role of urinary trypsin inhibitor in acute lung injury induced by lipopolysaccharide[J]. Int J Mol Med，2005，16(6)：1029－1033.

[16] 郭亮，唐忠志，张端莲. 乌司他丁对急性肺损伤组织中水通道蛋白及 Fas 表达的研究[J]. 重庆医学，2009，38(22)：2873－2875.

[17] 陆卫华，曾碧枚，许喜咏，等. 乌司他丁对家兔急性肺损伤保护的实验研究[J]. 重庆医学，2009，38(15)：1918－1920.

[18] Bingyang J，Jinping L，Mingzheng L，*et al*. Effects of urinary protease inhibitor on inflammatory response during on-pump coronary revascularisation. Effect of ulinastatin on inflammatory response[J]. J Cardiovasc Surg (Torino)，2007，48(4)：497－503.

[19] Rossier B C，Stutts M J. Activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by serine proteases[J]. Annu Rev Physiol，2009，71：361－379.

[20] Adebamiro A，Cheng Y，Johnson J P，*et al*. Endogenous protease activation of ENaC：effect of serine protease inhibition on ENaC single channel properties[J]. J Gen Physiol，2005，126(4)：339－352.

（**收稿**：2009-12-10；**修回**：2010-01-18）

（编辑 龙 亮）