论著

文章编号:1000-5404(2010)15-1594-04

慢性机械压力诱导气道上皮黏蛋白5AC的表达

吴砚樵,周向东 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院呼吸内科)

【摘要】 目的 探讨慢性机械压力能否诱导气道上皮黏蛋白(mucin,MUC)5AC表达及通过的相关信号通路。方法 培养大鼠气道上皮细胞建立气液相界面(air liquid interface,ALI),通过对Transwell培养板上的气道上皮细胞每天施加10、20、30 cmH_2O水平的气体压力1 h并持续7 d来模拟慢性机械压力作用,并以表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)特异性抑制剂AG1478、细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)激酶抑制剂PD98059分别作为干预因素处理细胞。将细胞分为空白对照组、单纯压力组、AG1478 + 30 cmH_2O压力组、PD98059 + 30 cmH_2O压力组,单纯压力组分为10、20、30 cmH_2O 3个压力水平。RT-PCR检测MUC5AC mRNA表达水平,ELISA法检测MUC5AC蛋白含量,Western blot检测磷酸化ERK(p-ERK)、磷酸化c-Jun氨基末端激酶(phosphorylated c-Jun N-terminal kinase,p-JNK)和磷酸化P38(p-P38)水平。结果 与空白对照组比较,单纯压力组MUC5AC蛋白及mRNA表达水平随压力水平的升高而升高($P<0.05$),呈压力依赖性,同时伴随p-ERK蛋白含量增加($P<0.05$),但p-JNK和p-P38含量没有明显变化($P>0.05$)。30 cmH_2O压力水平MUC5AC蛋白及mRNA表达水平[(0.65 ± 0.09)、(0.62 ± 0.04)]明显高于空白对照组[(0.28 ± 0.04)、(0.20 ± 0.05),$P<0.01$],p-ERK蛋白含量(0.68 ± 0.05)较空白对照组(0.27 ± 0.07)显著增加($P<0.01$)。应用AG1478和PD98059分别预处理后,MUC5AC蛋白、mRNA表达水平及p-ERK蛋白水平在AG1478 + 30 cmH_2O压力组分别为(0.39 ± 0.08)、(0.40 ± 0.06)、(0.25 ± 0.04),PD98059 + 30 cmH_2O压力组分别为(0.36 ± 0.09)、(0.38 ± 0.13)、(0.26 ± 0.11),与单纯压力组30 cmH_2O水平比较均显著降低($P<0.05$)。结论 慢性机械压力能诱导气道上皮MUC5AC表达增加,这一作用可能通过机械压力压缩侧面胞间隙来实现,而EGFR及ERK信号通路参与其中。

【关键词】 压力;黏蛋白类;表皮生长因子受体;细胞外信号调节MAP激酶类;气管;上皮细胞;大鼠
【中图法分类号】 R322.33;R363.11;R394.3 【文献标志码】 A

Chronic mechanical stress induces mucin 5AC protein expression in rat airway epithelial cells *in vitro*

Wu Yanqiao, Zhou Xiangdong (Department of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of chronic mechanical stress on mucin (MUC)5AC expression in airway epithelial cells of rats and its possible signaling pathway. Methods Airway epithelial cells from rats were cultured on transwell membrane at an air-liquid interface, stimulated by chronic mechanical stress from air pressure and pre-treated with EGFR kinase inhibitor AG1478 and specific inhibitor of the ERK pathway PD-98059, respectively. The cells were divided into negative control group, stress treatment group, AG1478 pre-treatment group, and PD98059 pre-treatment group. Chronic mechanical stress was induced by 10, 20 and 30 cmH_2O, respectively in stress treatment group. MUC5AC protein was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. MUC5AC mRNA level was analyzed by RT-PCR. Protein levels of p-JNK, p-ERK and p-P38 were measured by Western blotting. Results The protein level of MUC5AC, mRNA and p-ERK was significantly higher in stress group than in control group ($P<0.05$). However, no significant difference was found in protein level of p-JNK and p-P38 between stress and control groups ($P>0.05$). The expression level of MUC5AC protein and mRNA was significantly higher in 30 cmH_2O stress group than in control group (0.65 ± 0.09 and 0.62 ± 0.07 *vs* 0.28 ± 0.04 and 0.20 ± 0.05, $P<0.01$). The expression level of p-ERK was also significantly higher in 30 cmH_2O stress group (0.68 ± 0.05) than in control group (0.27 ± 0.07, $P<0.01$). After pre-treatment with AG1478 and PD98059, the protein and mRNA expression levels of MUC5AC, and protein expression level of p-ERK was 0.39 ± 0.08, 0.40 ± 0.06, 0.25 ± 0.04 in AG1478 pre-treatment +

【基金项目】 国家自然科学基金(30770951)
【通信作者】 周向东,E-mail:zxd999@263.net

30 cmH_2O group, and 0.36 ± 0.09, 0.38 ± 0.13, 0.26 ± 0.11 in PD98059 pre-treatment + 30 cmH_2O group, which was significantly lower than in 30 cmH_2O stress group ($P < 0.05$). **Conclusion** Chronic mechanical stress can significantly up-regulate the expression of MUC5AC protein and mRNA by compressing the lateral intercellular space. EGFR and ERK signal pathways play a key role in the process.

[Key words] pressure; mucin; receptor, epidermal growth factor; extracellular signal-regulated map kinase; trachea; epithelial cell; rat

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30770951). Corresponding authoe: Zhou Xiangdong, E-mail: zxd999@263.net

黏液高分泌是许多呼吸道疾病的重要病理学特征,例如哮喘、慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)等都是以黏液高分泌为重要特征的难治性疾病。气道黏液的黏弹性主要取决于气道上皮杯状细胞和黏膜下腺体分泌的黏蛋白(mucin,MUC),其中 MUC5AC、MUC5B 和 MUC2 是气道中主要的黏蛋白表型,以往的研究显示病理情况下气道 MUC 以 MUC5AC 占优势,故气道上皮 MU5AC 的蛋白含量和 mRNA 的转录水平代表了气道黏液高分泌的强度[1]。这类慢性炎症性疾病往往伴有支气管收缩产生的气道狭窄,狭窄的管腔一方面使黏膜处于折叠状态,上皮细胞间相互挤压导致细胞受压增大;另一方面气道内压力相应增高,也加大了气道上皮细胞所受到的压力[2]。此外临床中日益广泛应用的正压机械通气也使得气道上皮细胞受压增加。Tschumperlin 等[3,4]报道机械压力能够间接通过压缩气道上皮细胞周围的侧面胞间隙(lateral intercellular space,LIS)经表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)信号通路完成细胞外机械信号向细胞内化学信号转导,并参与调节丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路。而 EGFR 与 MAPK 途径是已知的多种刺激因素诱导 MUC5AC 表达和杯状上皮化生的关键步骤[5]。因此,我们探讨机械压力对气道上皮 MUC5AC 表达是否有所影响及其具体分子调节机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

Transwell 培养板(Coning 公司),DMEM/F12 培养液、小牛血清、牛垂体提取物、Trizol、人 EGF、转铁蛋白(Sigma 公司),辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗小鼠抗体,HRP-羊抗兔抗体(Santa Cruz 公司),兔抗磷酸 ERK(p-ERK,BioVision 公司),兔抗磷酸化 JNK(p-JNK)、磷酸化 P38(p-P38,Santa Cruz 公司),小鼠抗大鼠呼吸道粘蛋白单克隆抗体 RTE11(美国 SH Randell 教授惠赠),EGFR 特异性抑制剂 AG1478 及 ERK 激酶抑制剂 PD98059(Cell Signaling 公司)。RIPA 裂解液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(碧云天生物技术研究所),其余试剂均为国产分析纯。

培养液配制:将 1∶1 DMEM/F12 培养基,配成含有 52 μg/ml 牛垂体提取物、25 ng/ml 人 EGF、10 μg/ml 胰岛素、0.5 μg/ml 氢化可的松、100 ng/ml 霍乱毒素、6.5 ng/ml T3、1.5 μg/ml 牛血清白蛋白、10 μg/ml 转铁蛋白、50 nmol 视黄酸、10 万 U/L 青霉素,50 ng/ml 两性霉素 B 的无血清培养液于 4 ℃避光保存。

1.2 大鼠气管上皮细胞的分离和气液相界面的培养

参照文献[6]。健康成年 Wistar 大鼠,体质量 200 ~ 250 g(重庆医科大学实验动物中心),麻醉后处死,分离气管,清除结缔组织,剖开气管注入 0.1% 胰蛋白酶,置 4 ℃过夜,消化分离气道上皮细胞。终止消化后经 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清。细胞重悬于含有 10% FBS 的培养液中预孵 2 h,以除去成纤维细胞。收集未贴壁细胞,接种于 Transwell 培养板中的多微孔聚碳酸酯膜上。Transwell 培养板插入配套 6 孔板中,形成上、下室。加入含 5% FBS 大鼠气管生长培养基 37 ℃ 5% CO_2 培养 24 h。换用配置好的无血清培养液继续培养,上下室培养液相同。每 2 天更换培养液至细胞长满纤维膜并融合,去掉上室培养液,建立气液相界面供实验使用,继续每 2 天更换下室培养液。

1.3 压力实验装置

按照文献[7]。Transwell 培养板上室加上带有进气嘴的硅胶塞形成密闭小室,进气嘴连接气泵,通过输送经过湿化的 37 ℃含 5% CO_2 的空气,控制上室气压,而下室仍处于大气压,这样多微孔纤维膜上的大鼠气管上皮细胞就会受到跨细胞压力。采用 10、20、30 cmH_2O 3 个压力水平模拟气道收缩时气道上皮细胞受到的压力。COPD 及哮喘时气道收缩具有慢性间断性特点,故采用每天 1 h 机械压力作用模拟全天气道收缩时间,并连续作用 7 d。

1.4 分组与干预因素

形成气液相界面(air liquid interface, ALI)的大鼠气管上皮细胞作为实验细胞分为 4 组:①空白对照组:无血清培养基继续培养,不予任何刺激;②单纯压力组:细胞每天分别施加 10、20、30 cmH_2O 压力 1 h,连续 7 d;③AG1478 + 30 cmH_2O 压力组:施加压力前 30 min 培养液中加入 EGFR 阻断剂 AG1478(1 μmol/L)进行预处理,其余条件不变;④PD98059 + 30 cmH_2O 压力组:施加压力前 30 min 培养液中添加 PD98059(50 μmol/L)进行预处理,其余条件不变。

1.5 观察指标

1.5.1 RT-PCR 检测黏蛋白 MUC5AC mRNA 采用 Trizol 法提取各组细胞的总 RNA,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,保存于 -20 ℃备用。随后以两步法行 RT-PCR,MUC5AC 的 PCR 引物序列:上游 5′-TGTTCTATGAGGGCTGCGTCT-3′,下游 5′-ATGTCGTGGGACGCACAGA-3′,由上海生工合成。参照 MMLV 第 1 链 cDNA 合成试剂盒说明书合成 cDNA 第 1 链,然后行 PCR 扩增。扩增条件:94 ℃预变性 3 min 终止;紧随 35 个循环,每 1 个循环 94 ℃变性 30 s,64 ℃复性 30 s,72 ℃延伸 90 s,后 72 ℃延伸 5 min 补

齐末端。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定，在240 bp处有GAPDH基因片段，约103 bp处为MUC5AC目的基因片段。电泳结果经光密度面积积分分析，以与管家基因GAPDH mRNA的比值作为目的基因mRNA的相对含量。

1.5.2　ELISA检测细胞裂解液MUC5AC含量　收集各组细胞，加入冰预冷的RIPA裂解液和相应1/100量的苯甲基磺酰氟化物(PMSF)，晃动、吹打后吸入EP管中冰浴20 min，4 ℃ 15 000 r/min离心20 min，留上清液。取上清液50 μl，与50 μl重碳酸盐一起于40 ℃包被96孔板，干燥，PBS洗板3次，含1%牛血清白蛋白的PBS室温封闭1 h，加入1∶500稀释的小鼠抗大鼠气道MUC单抗RTE11 100 μl，37℃孵育1 h，加入1∶1 000稀释的HRP标记羊抗鼠IgG 100 μl，37 ℃孵育1 h，四甲基联苯胺过氧化物酶溶液显色，终止反应后测各孔光密度值(λ=490 nm)，得到MUC5AC的相对值。

1.5.3　Western blot检测p-ERK、p-JNK以及p-P38蛋白含量　收集各组细胞，充分裂解，4 ℃ 12 000 r/min离心15 min，取上清液经SDS-PAGE电泳分离，转膜，于5%脱脂牛乳中封闭1 h后，以兔抗p-ERK(1∶1 000)、p-JNK(1∶1 000)和p-P38(1∶1 000)抗体室温孵育2 h，洗膜后加入HRP标记的山羊抗兔IgG(1∶10 000)，室温孵育2 h。彻底洗涤后经增敏化学发光法显色，结果经光密度面积积分分析，与内参照β-actin产物条带的比值作为相对含量。

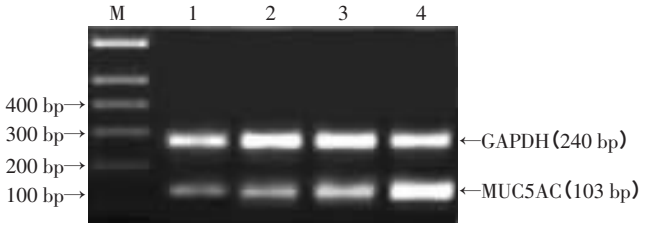
1.6　统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件，检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较行单因素方差分析；如差异有统计学意义，再进行组间的两两比较，行 t 检验。

2　结果

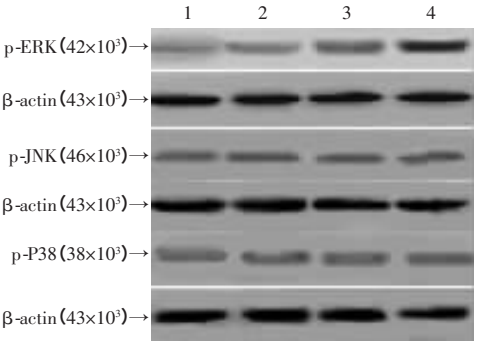
2.1　不同程度的机械压力对MUC5AC mRNA和蛋白水平以及p-ERK、p-JNK和p-P38含量的影响

与空白对照组比较，压力作用后各组MUC5AC mRNA、MUC5AC蛋白表达和p-ERK蛋白表达均增加，且随压力水平的升高而增加($P<0.05$)，呈压力依赖性。单纯压力组30 cmH_2O压力水平的MUC5AC转录和表达水平以及p-ERK蛋白表达与空白对照组相比显著升高($P<0.01$)，故后续实验均采用30 cmH_2O压力水平作为模拟病理状态下支气管收缩时上皮细胞所受压力。而p-JNK和p-P38蛋白含量在不同程度压力作用下无明显变化($P>0.05$)。见图1、2，表1。



M：标准；1：空白对照组；2：单纯压力组10 cmH_2O压力水平；3：单纯压力组20 cmH_2O压力水平；4：单纯压力组30 cmH_2O压力水平

图1　RT-PCR检测不同程度的机械压力对MUC5AC mRNA表达的影响



1：空白对照组；2：单纯压力组10 cmH_2O压力水平；3：单纯压力组20 cmH_2O压力水平；4：单纯压力组30 cmH_2O压力水平

图2　Western blot检测不同程度的压力对p-ERK、p-JNK以及p-P38蛋白表达的影响

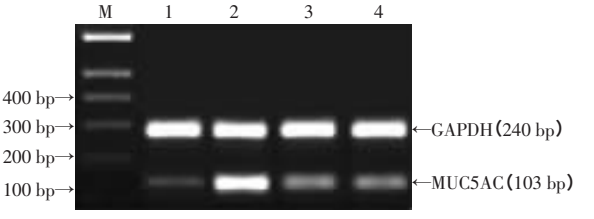
表1　不同程度的压力对MUC5AC、MUC5AC mRNA、p-ERK、p-JNK以及p-P38水平的影响($n=3$，$\bar{x} \pm s$)

组别	MUC5AC mRNA	MUC5AC	p-ERK	p-JNK	p-P38
空白对照组	0.20±0.05	0.28±0.04	0.27±0.07	0.17±0.08	0.19±0.05
单纯压力组					
10 cmH_2O	0.33±0.06[a]	0.37±0.09[a]	0.40±0.09[a]	0.21±0.07	0.23±0.12
20 cmH_2O	0.45±0.10[a]	0.42±0.08[a]	0.52±0.08[a]	0.27±0.13	0.25±0.09
30 cmH_2O	0.62±0.04[b]	0.65±0.09[b]	0.68±0.05[b]	0.24±0.03	0.20±0.05

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与空白对照组比较

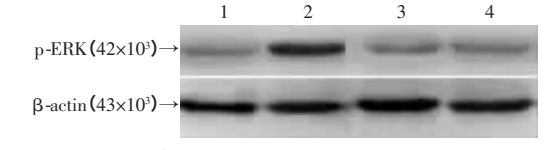
2.2　AG1478及PD98059干预对MUC5AC mRNA和MUC5AC蛋白以及p-ERK蛋白表达的影响

给予AG1478及PD98059预处理后，降低了单纯压力组30 cmH_2O压力水平MUC5AC mRNA水平及MUC5AC蛋白含量($P<0.05$)，同时也降低了p-ERK蛋白含量($P<0.05$)。见图3、4，表2。



M：标准；1：空白对照组；2：单纯压力组30 cmH_2O压力水平；3：AG1478+30 cmH_2O压力组；4：PD98059+30 cmH_2O压力组

图3　各组细胞MUC5AC mRNA的表达水平



1：空白对照组；2：单纯压力组30 cmH_2O压力水平；3：AG1478+30 cmH_2O压力组；4：PD98059+30 cmH_2O压力组

图4　各种干预因素对p-ERK蛋白表达的影响

表2　各组MUC5AC转录及表达以及p-ERK数量的变化($n=3$，$\bar{x} \pm s$)

组别	MUC5AC mRNA	MUC5AC	p-ERK
空白对照组	0.20±0.05	0.28±0.04	0.27±0.07
单纯压力组30 cmH_2O压力水平	0.62±0.04	0.65±0.09	0.68±0.05
AG1478+30 cmH_2O压力组	0.40±0.06[a]	0.39±0.08[a]	0.25±0.04[a]
PD98059+30 cmH_2O压力组	0.38±0.13[a]	0.36±0.09[a]	0.26±0.11[a]

a：$P<0.05$，与单纯压力组30 cmH_2O压力水平比较

3 讨论

伴随肺的膨胀和回缩,机械力学因素对肺组织的影响贯穿了生命的整个过程,机械力在调控肺的结构、功能和代谢方面起着重要的作用[8]。机械力学环境的异常也会带来相应的病理改变,因此研究机械力对黏液高分泌的作用有重要意义。气道上皮细胞并不是完全紧密地贴合在一起,细胞与细胞之间存在侧面胞间隙,这是处于上皮细胞之间的一个立体空间,其顶部由上皮细胞之间的紧密连接组成,相邻上皮细胞的侧表面围合而成 LIS 的侧面,这个空间由细胞外液填充,并具有高度的顺应性和可压缩性[9]。以往研究表明,机械力可通过直接作用于细胞膜、细胞骨架、某些特定跨膜蛋白和机械敏感性离子通道等传导入细胞内完成机械-化学信号转导[10]。而有研究表明机械压力还可以不依赖以上直接途径,通过压缩 LIS 体积,挤出部分细胞外液,使相邻上皮细胞膜更加靠近,造成 LIS 中 EFGR 密度增大,局部 EGFR 配体浓度上升,刺激 EGFR 通路间接完成细胞外向细胞内、机械向化学信号的转导,并能借助 MAPK 信号通路传导入细胞核引起细胞内 EGFR 配体合成增加,再次释放入 LIS,形成一个自分泌环路[11]。EGFR 是一种受体酪氨酸激酶(RTK),是多种刺激因素引起气道黏蛋白 MUC5AC 表达增加的中心途径。研究发现中性粒细胞弹力蛋白酶、香烟烟雾、脂多糖、佛波酯等刺激因子均能由 EGFR/ERK1/2 信号级联引起 MUC5AC 表达增多,黏液分泌增加[12]。而 MAPK 是 RTK 所介导信号传递途径中涉及到的一种重要蛋白激酶,其包括 4 个成员,ERK1/2、JNK、P38、BMK1,在介导黏液高分泌中均起到不同作用。香烟烟雾除通过配体依赖的 EGFR/ERK 途径激活 MUC5AC 外,还能通过非受体酪氨酸激酶信号途径 ROS/Src/JNK 参与 MUC5AC 基因转录及蛋白合成[13]。而 IL-13 能够通过 P38MAPK 途径增加 MUC5AC 表达[14]。因此机械压力很可能通过上述途径引发黏液高分泌相应的细胞结构和功能改变。

本实验采用不同程度的压力水平作用于 ALI 培养的大鼠气道上皮细胞,通过 RT-PCR 和 ELISA 方法发现慢性机械压力确实能够诱导 MUC5AC mRNA 转录水平及蛋白表达增加,且呈压力依赖性,30 cmH_2O 压力水平时 MUC5AC 表达增加最明显,与文献[15]报道相近。这一作用是否与机械压力压缩 LIS 产生的自分泌环路有关呢?进一步本研究发现机械压力诱导 MUC5AC 表达增加的同时伴随 ERK 磷酸化增加,但没有显著的 JNK 和 P38 磷酸化增加。随后对 30 cmH_2O 压力组给予 AG1478 和 PD98059 预处理,MUC5AC mRNA 和 MUC5AC 蛋白以及 p-ERK 蛋白均呈明显下调,结果表明机械压力是通过经典的受体依赖性 EGFR/ERK 信号通路诱导 MUC5AC 高分泌,与机械压力通过 LIS 的信号转导通路相符。

本实验结果表明,机械压力能够诱导 MUC5AC 表达增加,EGFR 与 ERK 通路参与其中,研究深化了我们对气道黏液高分泌调控机制的认识,为临床应用中强调尽快、尽早纠正疾病状态下气道收缩狭窄状态以及机械通气时气道压力水平的控制提供了有利的理论依据。

参考文献:

[1] 周向东, 童瑾, 兰箭. 慢性阻塞性肺疾病患者气道粘蛋白分子表型的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(7):437.

[2] Wiggs B R, Hrousis C A, Drazen J M, *et al*. On the mechanism of mucosal folding in normal and asthmatic airways[J]. J Appl Physiol, 1997, 83(6):1814-1821.

[3] Tschumperlin D J, Dai G, Maly I V, *et al*. Mechanotransduction through growth-factor shedding into the extracellular space[J]. Nature, 2004, 429(6987):83-86.

[4] Tschumperlin D J, Shively J D, Swartz M A, *et al*. Bronchial epithelial compression regulates MAP kinase signaling and HB-EGF-like growth factor expression[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 282(5):L904-L911.

[5] 李琪, 周向东. 中性粒细胞弹力蛋白酶引起黏蛋白 5AC 高表达的信号转导机制[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(5):348-352.

[6] 高元妹, 徐军. 小鼠气管上皮细胞的气液相界面培养[J]. 广东医学, 2008, 29(2):217-219.

[7] Ressler B, Lee R T, Randell S H, *et al*. Molecular responses of rat tracheal epithelial cells to transmembrane pressure[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 278(6):L1264-L1272.

[8] Wirtz H R, Dobbs L G. The effects of mechanical forces on lung functions[J]. Respir Physiol, 2000, 119(1):1-17.

[9] Spring K R, Hope A. Size and shape of the lateral intercellular spaces in a living epithelium[J]. Science, 1978, 200(4337):54-58.

[10] Hamill O P, Martinac B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells[J]. Physiol Rev, 2001, 81(2):685-740.

[11] Chu E K, Foley J S, Cheng J, *et al*. Bronchial epithelial compression regulates epidermal growth factor receptor family ligand expression in an autocrine manner[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 32(5):373-380.

[12] Burgel P R, Nadel J A. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium[J]. Thorax, 2004, 59(11):992-996.

[13] Gensch E, Gallup M, Sucher A, *et al*. Tobacco smoke control of mucin production in lung cells requires oxygen radicals AP-1 and JNK[J]. J Biol Chem, 2004, 279(37):39085-39093.

[14] Fujisawa T, Ide K, Holtzman M J, *et al*. Involvement of the p38 MAPK pathway in IL-13-induced mucous cell metaplasia in mouse tracheal epithelial cells[J]. Respirology, 2008, 13(2):191-202.

[15] Gunst S J, Stropp J Q. Pressure-volume and length-stress relationships in canine bronchi *in vitro*[J]. J Appl Physiol, 1988, 64(6):2522-2531.

(收稿 2010-04-15 修回 2010-05-25)
(编辑 吴培红)