[5] VAN SCHAIJIK B, DAVIS P F, WICKREMESEKERA A C, et al. Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review [J]. J Clin Pathol, 2018, 71(1): 88-91.
[6] VILLODRE E S, KIPPER F C, PEREIRA M B, et al. Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis [J]. Cancer Treat Rev, 2016, 51(10): 1-9.
[7] TIAN Q, WANG L, SUN X, et al. Scopoletin exerts anticancer effects on human cervical cancer cell lines by triggering apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of cell invasion and PI3K/AKT signalling pathway [J]. J BUON, 2019, 24(3): 997-1002.
[8] LIU R, WANG L, GAN T, et al. Long noncoding RNA LINC00511 promotes cell growth and invasion in triple-negative breast cancer by interacting with snail [J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 5691-5699. doi: 10.2147/CMAR.S203455.
[9] YIN X, LI Y W, JIN J J, et al. The clinical and prognostic implications of pluripotent stem cell gene expression in hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Lett, 2013, 5(4): 1155-1162.
[10] VADDI P K, STAMNES M A, CAO H, et al. Elimination of SOX2/OCT4-associated prostate cancer stem cells blocks tumor development and enhances therapeutic response [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(9): e1331.
[11] CHEN B, ZHU Z, LI L, et al. Effect of overexpression of Oct4 and Sox2 genes on the biological and oncological characteristics of gastric cancer cells [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 4667-4682. doi: 10.2147/OTT.S209734.
[12] MONFERRER E, BURGOS-PANADERO R, BLANQUER-MACEIRAS M, et al. High Oct4 expression: implications in the pathogenesis of neuroblastic tumours [J]. BMC Cancer, 2019. DOI: 10.1186/s12885-018-5219-3.
[13] CHEN H Y, HAN X L, WANG R G, et al. The expression of Oct4 and its clinical significance in laryngeal squamous carcinoma tissues [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(20): 4591-4594.
[14] ZHANG X, ZHANG Y, XU J, et al. Antigen presentation of the Oct4 and Sox2 peptides by CD154-activated B lymphocytes enhances the killing effect of cytotoxic T lymphocytes on tumor stem-like cells derived from cisplatin-resistant lung cancer cells [J]. J Cancer, 2018, 9(2): 367-374.
[15] LU C S, SHIEH G S, WANG C T, et al. Chemotherapeutics-induced Oct4 expression contributes to drug resistance and tumor recurrence in bladder cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(19): 30844-30858.
[16] KOBAYASHI I, TAKAHASHI F, NURWIDYA F, et al. Oct4 plays a crucial role in the maintenance of gefitinib-resistant lung cancer stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 473(1): 125-132.
[17] FENG Y H, SU Y C, LIN S F, et al. Oct4 upregulates osteopontin via Egr1 and is associated with poor outcome in human lung cancer [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 791.
[18] FUJINO S, MIYOSHI N. Oct4 gene expression in primary colorectal cancer promotes liver metastasis [J]. Stem Cells Int, 2019: 7896524. doi: 10.1155/2019/7896524.
[19] ZHAO Q W, ZHOU Y W, LI W X, et al. Akt-mediated phosphorylation of Oct4 is associated with the proliferation of stem-like cancer cells [J]. Oncol Rep, 2015, 33(4): 1621-1629.

（编辑：刘雄志）
（收稿日期：2019-09-17　修回日期：2019-10-23）

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2020.05.003

· 论著 ·

泼尼松对支气管上皮细胞黏蛋白 5AC、细胞间黏附分子-1、白细胞介素-6 分泌的影响

王笑秋[1]，张平波[1]，陆烨[1]，方凤[1]，鲍一笑[1,2]（1. 上海浦滨儿童医院，上海　200120；2. 国家儿童医学中心，上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心，上海　200127）

[摘要] **目的**：探讨泼尼松对脂多糖（LPS）诱导的支气管上皮细胞黏蛋白 5AC（MUC5AC）、细胞间黏附分子-1（ICAM-1）、白细胞介素-6（IL-6）分泌的影响。**方法**：体外分离鉴定原代支气管上皮细胞，LPS 以 1 μg/mL 剂量诱导细胞炎症反应，泼尼松 5、10、20、40、50、100 μmol/L 干预治疗，酶联免疫法（ELISA）检测细胞上清液 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 水平变化，采用定量逆转录 PCR（RT-PCR）、免疫印迹（Western-blot）检测 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 mRNA 和蛋白表达情况，免疫荧光法检测核因子 κB（NF-κB）核定位，Western-blot 检测泼尼松干预治疗前后表皮生长因子受体（EGFR）、细胞外调节蛋白激酶 1/2（ERK1/2）活化情况。**结果**：泼尼松以剂量依赖性降低 LPS 诱导的支气管上皮细胞内 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 mRNA 水平和蛋白水平，抑制 NF-κB、EGFR、ERK1/2 活化。**结论**：泼尼松在体外能抑制 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 的产生，其机制可能与抑制 NF-κB、EGFR、ERK1/2 的激活有关。

[关键词] 支气管上皮细胞；泼尼松；黏蛋白 5AC；细胞间黏附分子-1；白细胞介素-6
[中图分类号] R725.6　　[文献标识码] A　　[文章编号] 1672-108X(2020)05-0007-05

作者简介：王笑秋（1975.10-），女，博士，主治医师，主要从事儿童呼吸系统疾病研究，E-mail：zylwxq0451@163.com。
通讯作者：鲍一笑（1964.12-），男，博士，教授，主要从事儿童哮喘相关研究，E-mail：drsmilebao@163.com。

Effects of Prednisone on Secretion of Mucin-5 Subtype AC, Ntercellular Adhesion Molecule-1 and Interleukin-6 in Bronchial Epithelial Cells

Wang Xiaoqiu[1], Zhang Pingbo[1], Lu Ye[1], Fang Feng[1], Bao Yixiao[1,2](1. *Shanghai Pubin Children's Hospital, Shanghai* 200120, *China*; 2. *National Children's Medical Center, Shanghai Children's Medical Center Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai* 200127, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To probe into the effects of prednisone on secretion of mucin-5 subtype AC (MUC5AC), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and interleukin-6 (IL-6) in lipopolysaccharide (LPS) induced human bronchial epithelial cells. **Methods**: Primary human bronchial epithelial cells were isolated and identified in vitro. And 1 μg/mL of LPS was used to induce cell inflammatory response. And 5, 10, 20, 40, 50, 100 μmol/L of prednisone was used as intervention treatment. The levels of MUC5AC, ICAM-1 and IL-6 in cell supernatants was measured by euzymelinked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of MUC5AC, ICAM-1, IL-6 mRNA and protein were determined by real-time PCR (RT-PCR) and Western-blot. Immunofluorescence method was used to detect nuclear localization of nuclear factor-κB (NF-κB). Epidermal growth factor receptor (EGFR) and extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) phosphorylation before and after prednisone intervention were determined by Western-blot. **Results**: Prednisone inhibited the expression levels of MUC5AC, ICAM-1, IL-6 mRNA and protein in a dose-dependent manner in LPS induced human bronchial epithelial cells. Meanwhile, prednisone suppressed NF-κB, EGFR and ERK1/2 phosphorylation. **Conclusion**: In response to LPS induced inflammation, prednisone inhibits the expression levels of MUC5AC, ICAM-1 and IL-6 in vitro, which may be related to NF-κB, EGFR and ERK1/2 activation.

[**Keywords**]bronchial epithelial cells; prednisone; mucin-5 subtype AC; intercellular adhesion molecule-1; interleukin-6

支气管哮喘简称哮喘,是由多种细胞(如嗜酸粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞及支气管上皮细胞等)和细胞因子及炎症介质共同参与的气道慢性炎症性疾病[1],涉及一系列炎症信号应答调控机制。黏蛋白属于糖蛋白,覆盖呼吸道上皮细胞表面,为抵御外来刺激物的保护屏障,黏液异常分泌与支气管哮喘密切相关。黏蛋白 5AC(mucin-5 subtype AC,MUC5AC)是气道黏液蛋白的主要成分,通常被作为临床哮喘患者的主要生化标志。细胞间黏附因子-1(intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)是反映呼吸道上皮炎症损伤、气道反应性等的重要指标。白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)水平和哮喘的严重程度与肺功能密切相关[2]。糖皮质激素是由肾上腺皮质束状带分泌的一类甾体激素,具有抑制免疫应答、抗炎、抗病毒等作用,能干扰花生四烯酸代谢、减少白三烯和前列腺素的生成,抑制嗜酸粒细胞趋化、活化及细胞因子合成,减少微血管渗漏,增加细胞膜上 β_2 受体合成等,提示糖皮质激素对支气管哮喘的治疗具有重要意义。因此,本研究旨在探讨泼尼松(prednisone)能否抑制脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导支气管上皮细胞产生的 MUC5AC、ICAM-1、IL-6,以及该机制是否与核因子 κB(nuclear factor-κB,NF-κB)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase 1/2,ERK1/2)的激活有关。

1　材料和方法

1.1　支气管上皮细胞分离培养

肺叶癌患者手术切除的癌旁正常支气管组织(经由患者签署知情同意书并通过上海交通大学医学院附属新华医院医学伦理委员会审查)。按文献[3]方法制备,无菌新鲜肺叶组织置含青霉素、链霉素双抗的预冷 PBS 反复冲洗若干次,手术剪剔除气管周围结蹄组织以及血管后,预冷 PBS 充分清洗管腔内的淤血和黏液,剪成 1 mm×1 mm×1 mm 左右的组织块,采用组织贴块法,将其置预先铺有Ⅳ型胶原(Sigma,C-5138)的 24 孔板内,加入无血清支气管上皮细胞生长培养基(0.4% 牛垂体提取物、5 mg/mL 人胰岛素、0.5 μg/mL 人表皮生长因子、0.5 mg/mL 肾上腺素、0.5 mg/mL 氢化可的松、6.7 μg/mL 三碘-L-甲腺原氨酸、0.1 μg/mL 视黄酸的无血清培养液),4 ℃避光保存,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱过夜培养。隔天换液一次,至上皮细胞于组织块四周单层生长密度至 80% 左右,消化传代。

1.2　脂多糖诱导的炎症模型的建立

为筛选 LPS 诱导最佳作用时间点,培养的支气管上皮细胞经过 LPS(1 μg/mL)不同时间点刺激后采用免疫荧光法检测 p65 核定位及 Western-Blot 检测 p-EGFR、EGFR、p-ERK1/2、ERK1/2 蛋白水平变化情况。

1.2.1　免疫荧光检测支气管上皮细胞 p65 核定位　细胞接种于 24 孔板,次日经过 LPS 不同时间点(0、20、40、60 min)刺激,4% 甲醛固定,0.1% TritonX-100 及 3% H_2O_2 分别孵育,1% BSA 封闭,NF-κB 一抗(1∶200)过夜,二抗室温孵育 2 h,DAPI 染核 5~10 min,荧光显微镜下观察荧光。

1.2.2　Western-Blot 检测 p-EGFR、EGFR、p-ERK1/2、ERK1/2 蛋白水平变化　基础蛋白裂解液使用前加入蛋白酶抑制剂,裂解细胞,BCA 法测定蛋白浓度,定量 100 μg 蛋白样品上样,10%~12% 聚丙烯酰胺凝胶分离,转印至活化的 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加入 p-EGFR、EGFR、p-ERK1/2、ERK1/2 抗体稀释液,4 ℃冰箱过夜,含 0.1% Tween 的 Tris-HCL 缓冲盐溶液洗涤

3～5 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,ECL 发光显色。以目的条带与内参条带灰度值的比值作为目的基因表达量。

1.3 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 蛋白水平检测

人 MUC5AC ELISA 试剂盒购自 Elabsience,ICAM-1 及 IL-6ELISA 试剂盒购自博士德生物公司。根据实验目的设置组别如下:(1)空白组;(2)LPS 组;(3)LPS+泼尼松(5、10、20、40、50、100 μmol/L)组。细胞接种于 24 孔板,泼尼松预处理细胞,过夜孵育,然后 LPS 刺激各实验组 20 min,收集细胞上清,按说明书操作步骤进行 MUC5AC、ICAM、IL-6 蛋白水平检测,酶标仪下 450 nm 波长处测定各孔的吸光度。Western-blot 法同上。

1.4 MUC5AC、ICAM、IL-6 mRNA 水平检测

细胞处理结束后,Trizol-氯仿一步法抽提各组细胞 RNA,利用 Oligo(dT)引物及逆转录酶将 0.5 μL RNA 逆转录为 cDNA,Primer 5.0 软件设计实时引物。MUC5AC 正向引物:5'-CAGCCACGTCCCCTTCAATA-3';反向引物:5'-ACCGCATTTGGGCATCC-3'。ICAM-1 正向引物:5'-AGCCCAAGTTGTTGGGCATAGAG-3';反向引物:5'-CAGTACACGGTGAGGAAGGT-3'。IL-6 正向引物:5'-CGCCTTCGGTCCAGTTG-3';反向引物:5'-TCGTTCTGAAGAGGTGAGTG-3'。Real-time 试剂盒购自南京百斯凯科技有限公司,利用 Eppendorfrealplex PCR 仪进行扩增:95 ℃ 30 s;55 ℃ 20 s;72 ℃ 20 s,共 40 个循环。样品目的基因的相对表达率(relative expression, RQ)采用 $\Delta\Delta C_t$ 方法计算,$RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$(C_t 表示 PCR 扩增过程中荧光信号强度达到阈值所需要的循环数)。ΔC_t 实验组 $=C_t$(实验组目的基因循环数)$-C_t$(实验组内参 GAPDH 循环数),ΔC_t 对照组 $=C_t$(对照组目的基因循环数)$-C_t$(对照组内参 GAPDH 循环数),$\Delta\Delta C_t=\Delta C_t$ 实验组$-\Delta C_t$ 对照组。实验重复 3 次。

1.5 p-EGFR、EGFR、p-ERK1/2、ERK1/2 信号通路蛋白表达检测

采用 Western-blot 法,基础裂解液使用前加入蛋白酶抑制剂,提取各实验组蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,定量各孔点样,经 10%～12% SDS-PAGE 跑胶后,转印至 PVDF 膜,分别加入 p-EGFR(ab53013)、EGFR(ab32530)、p-ERK1/2(AM071)、ERK1/2(AM076)抗体稀释液,4 ℃ 冰箱过夜,含 0.1% Tween 的 Tris-HCL 缓冲盐溶液洗涤 3～5 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,ECL 发光显色。以目的条带与内参条带灰度值的比值作为目的基因表达量。

1.6 免疫荧光检测支气管上皮细胞 NF-κB 核定位

细胞处理结束后,4% 甲醛固定各实验组细胞 30 min,0.1% TritonX-100 及 3% H_2O_2 分别孵育,1% BSA 封闭,NF-κB 一抗(1∶200)过夜,二抗室温孵育 2 h,DAPI 染核 5～10 min,荧光显微镜下观察荧光。

1.7 统计学方法

应用 SPSS20.0 软件及 Image J 软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组比较采用 One-Way ANOVA 分析,两两比较方差齐性则采用 LSD-t 检验,若方差不齐则采用 Dunnett's T3 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 诱导人支气管上皮细胞炎症模型建立

2.1.1 支气管上皮细胞 P65 核定位 LPS 刺激 20 min 荧光强度最强,伴随时间延长荧光亮度减弱,见图 1～4。

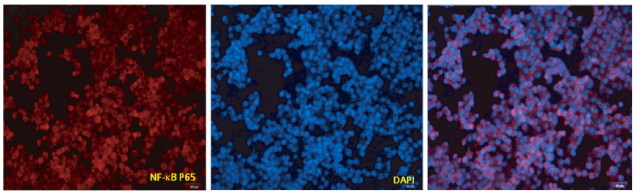


图 1 支气管上皮细胞经过 LPS 0 min 刺激后免疫荧光染色(×200)

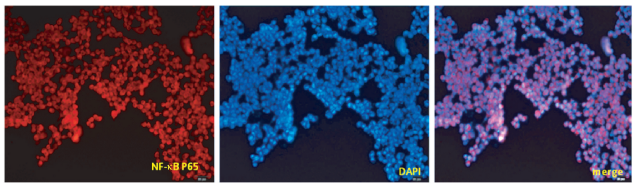


图 2 支气管上皮细胞经过 LPS 20 min 刺激后免疫荧光染色(×200)

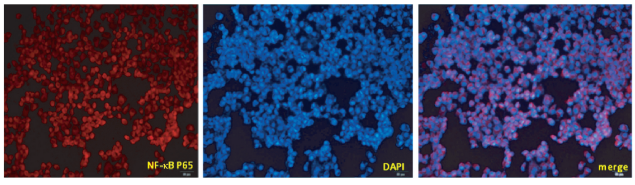


图 3 支气管上皮细胞经过 LPS 40 min 刺激后免疫荧光染色(×200)

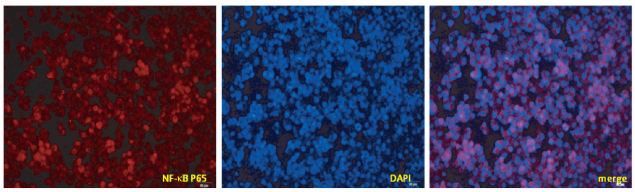


图 4 支气管上皮细胞经过 LPS 60 min 刺激后免疫荧光染色(×200)

2.1.2 p-EGFR、EGFR、p-ERK1/2、ERK1/2 蛋白水平变化 EGFR 的磷酸化伴随时间延长,明显活化;ERK1/2 的磷酸化时间峰点在 20 min。见图 5。

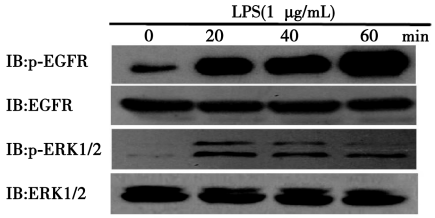


图 5 LPS 诱导人支气管上皮细胞 p-EGFR、EGFR、p-ERK1/2、ERK1/2 蛋白水平

2.2 ELISA 检测上清液 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 水平

泼尼松与致炎因子 LPS 共同孵育人支气管上皮细胞,结果显示空白组、LPS 组、LPS+泼尼松治疗组比较差

异有统计学意义($P<0.01$)。泼尼松能下调 LPS 诱导人支气管上皮细胞上清液 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 水平,且呈现一定药物梯度浓度。见表 1。

表 1　各组培养液上清液 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 水平　pg/mL

组别	实验复孔	MUC5AC	ICAM-1	IL-6
空白组	3	27.77±5.80	117.50±15.00	114.43±20.00
LPS 组	3	71.87±9.62	317.50±10.00	212.06±21.99
LPS+泼尼松 5 μmol/L 组	3	59.05±6.22	235.83±22.55	84.59±7.51
LPS+泼尼松 10 μmol/L 组	3	46.23±2.78	220.83±12.58	45.76±3.50
LPS+泼尼松 20 μmol/L 组	3	39.82±5.24	282.50±20.00	26.28±5.91
LPS+泼尼松 40 μmol/L 组	3	24.95±1.60	165.83±15.28	10.06±1.09
LPS+泼尼松 50 μmol/L 组	3	22.64±7.71	197.50±0.00	10.18±1.05
LPS+泼尼松 100 μmol/L 组	3	18.28±3.11	167.50±5.00	17.28±1.75
F		32.25	62.31	119.61
P		<0.01	<0.01	<0.01

2.3　RT-PCR 检测支气管上皮细胞 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 mRNA 表达水平

泼尼松设置三种浓度即 10、20、50 μmol/L,与致炎因子 LPS 共孵育人支气管上皮细胞,结果显示泼尼松能下调 LPS 诱导支气管上皮细胞内炎症蛋白 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 mRNA 水平,采用相对定量进行统计学分析,计算相对表达量 $=2^{-\Delta\Delta Ct}$,MUC5AC、IL-6 mRNA 水平比较差异有统计学意义($P<0.05$),且呈现一定药物梯度浓度。见表 2。

表 2　各组细胞内 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 mRNA 表达水平

组别	实验复孔	MUC5AC	ICAM-1	IL-6
空白组	3	1.01±0.12	1.02±0.22	1.00±0.25
LPS 组	3	2.27±0.47	1.97±0.90	1.40±0.59
LPS+泼尼松 10 μmol/L 组	3	1.37±0.02	1.87±0.88	1.38±0.50
LPS+泼尼松 20 μmol/L 组	3	0.61±0.12	1.08±0.07	1.31±0.12
LPS+泼尼松 50 μmol/L 组	3	0.16±0.01	0.68±0.01	0.28±0.00
F		25.26	3.71	4.99
P		<0.05	>0.05	<0.05

2.4　Western-blot 检测结果

LPS+泼尼松治疗组 MUC5AC、IL-6、ICAM-1 蛋白水平灰度比值结果低于 LPS 组($P<0.05$),且呈现一定剂量依赖性,见图 6。细胞通路 EGFR、ERK1/2 蛋白经由 LPS 诱导后明显活化,泼尼松不同浓度梯度干预治疗,能有效减弱 EGFR、ERK1/2 磷酸化水平,见图 7。

2.5　免疫荧光检测 NF-κB 核定位

空白组细胞经由外界 LPS 刺激,NF-κB 蛋白绿色荧光定位至细胞核内,细胞质和细胞核均呈现绿色荧光,而泼尼松预处理后,核内绿色荧光减弱,呈现一定的浓度梯度趋势,见图 8。

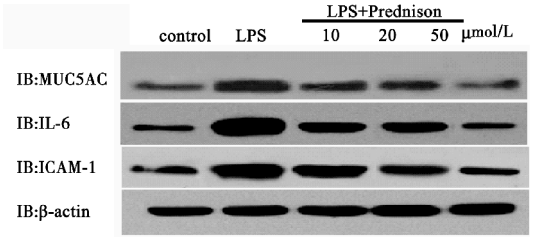


图 6　支气管上皮细胞 MUC5AC、IL-6、ICAM-1 蛋白水平

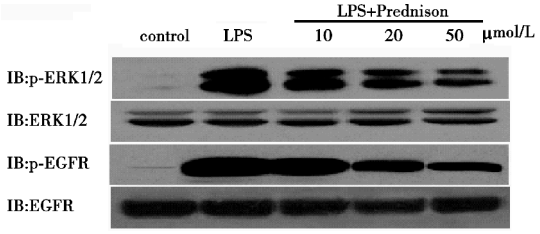


图 7　细胞通路 EGFR、ERK1/2 磷酸化水平

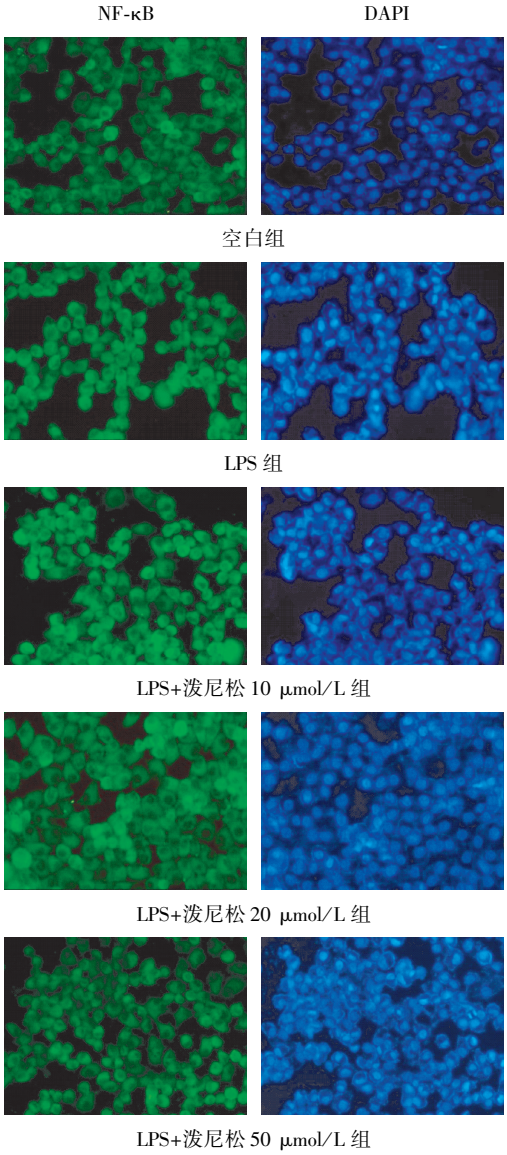


图 8　支气管上皮细胞 NF-κB 免疫荧光染色(×200)

3　讨论

支气管哮喘是由多种炎症细胞、细胞因子和炎症介质参与的气道炎症性疾病,涉及复杂的炎症信号调控机制。糖皮质激素具有广泛的抗炎作用可有效改善病情,因此深入研究其功能及保护调节机制,对支气管哮喘的治疗有重要意义。

MUC5AC 是气道上皮细胞分泌的主要黏蛋白,主要生理功能是增加黏液的黏稠性,其合成受 EGFR 信号传递系统调节[4]。EGFR 是蛋白酪氨酸激酶受体家族成员

之一,其活化是气道上皮组织分泌黏蛋白的必要和充分条件,哮喘气道上皮组织中 EGFR 及其配体表达上调,且表达量与气道杯状细胞数量呈正相关,成为治疗哮喘黏液高分泌的可能靶点[5-6]。EGFR 存在于正常肺的基底层上皮细胞、分泌性上皮细胞(腺体和气道)及间质细胞中的分子量为 170 000 的跨膜糖蛋白,与配体结合后,发生二聚体化和自身磷酸化,参与调节正常细胞的生长和分化。在体外培养正常人气道上皮细胞中,通过活化 EGFR 表达,可诱导杯状细胞化生并上调 MUC5AC 基因表达[7]。

ICAM-1 参与调节炎症反应、免疫应答反应,是被研究最多的黏附分子。研究表明炎症细胞浸润主要是通过黏附分子的表达上调完成,是各种气道炎症性疾病发病机制的关键[8]。NF-κB 是一种调控基因表达的 DNA 结合蛋白,可通过调控细胞因子和黏附分子基因的表达,参与机体的各种炎症和免疫反应[9]。在哮喘的气道炎症反应中,TNF-α、IL-1β、IL-6、ICAM-1 等众多细胞因子和炎症介质在基因转录水平上均受 NF-κB 调控,NF-κB 活化后这些细胞因子和炎症介质的基因表达和蛋白分泌均增高[10]。细胞处于静息状态时,NF-κB 由 p65、p50 与 IκB 以无活性三聚体位于细胞质内,经外源多种刺激后,IκB 激酶(IκB kinase, IKK)被激活,IκB 迅速发生磷酸化,与 NF-κB 解离,导致 NF-κB 定位到细胞核内,调控多种炎症因子表达[11],包括 TNF-α、IL-1β、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、趋化因子、黏附分子、集落刺激因子等[12]。

丝裂原活化蛋白激酶(mito-activated protein kinase, MAPK)信号转导通路是细胞内至关重要的信号通路[13-14],MAPK 家族有一条经典的亚族通路是 ERK1/2,该通路能被 LPS 激活,激活下游大量炎症介质[15],促使炎症发生发展,ERK 通路活化的标志即其磷酸化水平表达量增高。Kim E H 等[16]研究发现,屋尘螨可以通过 ERK、NF-κB 等信号通路抑制中性粒细胞凋亡,促进 IL-6、IL-8、TNF-α 等炎症因子的表达,从而介导过敏性鼻炎、哮喘的发生。

本研究成功建立 LPS 体外诱导人支气管上皮细胞炎症反应模型,检测发现该模型 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 mRNA 及蛋白水平明显增加,采用泼尼松体外进行浓度梯度治疗后,能显著减少 MUC5AC、ICAM-1、IL-6 mRNA 及蛋白水平的表达,并且抑制 EGFR、ERK1/2、NF-κB 磷酸化水平。糖皮质激素能有效减轻细胞的炎症反应,可能与抑制 EGFR、ERK1/2、NF-κB 的活化有关。本研究为体外实验,需进一步建立小鼠炎症模型,探索药物在体内治疗的机制,并完善 EGFR、ERK1/2、NF-κB 上游信号分子的参与机制,为临床治疗提供理论基础。

参考文献:

[1] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘诊断与治疗防治指南[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(10): 745-753.

[2] RINCON M, IRVIN C G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases [J]. Int J BiolSci, 2012, 8(9): 1281-1290.

[3] 高元妹, 张平, 夏旸, 等. 人支气管上皮细胞原代培养方法的对比研究[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(15): 2698-2699.

[4] TAKEYAMA K, DABBAGHK K, LEE H M, et al. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(6): 3081-3086.

[5] NADEL J A. Role of epidermal growth factor receptor activation in regulating mucin synthesis [J]. Respir Res, 2001, 2(2): 85-89.

[6] TAKEYAMA K, FAHY J V, NADEL J A. Relationship of epidermal growth factor receptor to goblet cell production in human bronchi [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(2): 511-516.

[7] CASALINO-MATSUDA S M, MONZON M E, FORTEZA R M. Epidermal growth factor receptor activation by epidermal growth factor receptor mediates oxidant-induced goblet cell metaplasia in human airway epithelium [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, 34(5): 581-591.

[8] LEE K S, JIN S M, KIM H J, et al. Matrix metalloproteinase inhibitor regulates inflammatory cell migration by reducing ICAM-1 and VCAM-1 expression in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 111(6): 1278-1284.

[9] BLACKWELL T S, CHRISTMAN J W. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17(1): 3-9.

[10] BARNES P J, ADCOCK I M. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy [J]. Trends Pharmacol Sci, 1997, 18(2): 46-50.

[11] OU X M, FENG Y L, WEN F Q, et al. Macrolides attenuate mucus hypersecretion in rat airways through inactivation of NF-kappa B [J]. Respirology, 2008, 13(1): 63-72.

[12] KUMAR A, TAKADA Y, BORIEK A M, et al. Nuclear factor-kappa B: its role in health and disease [J]. J Mol Med (Berl), 2004, 82(7): 434-448.

[13] WENG C J, CHAU C F, HSIEH Y S, et al. Lucidenic acid inhibits PMA-induced invasion of human hepatoma cells through inactivating MAPK/ERK signal transduction pathway and reducing binding activities of NF-kappa B and AP-1 [J]. Carcinogenesis, 2008, 29(1): 147-156.

[14] LIM J H, KIM H J, KOMATSU K, et al. Differential regulation of streptococcus pneumonia-induced human MUC5AC mucin expression through distinct MAPK pathways [J]. Am J Transl Res, 2009, 1(3): 300-311.

[15] HE W, QU T, YU Q, et al. LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappa B and MAPK pathways in human dental pulp stem cells [J]. Int Endod J, 2013, 46(2): 128-136.

[16] KIM E H, LEE J S, LEE N R, et al. Regulation of constitutive neutrophil apoptosis due to house dust mite allergen in normal and allergic rhinitis subjects [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e105814.

(编辑:刘雄志)

(收稿日期:2018-09-14 修回日期:2018-11-17)