基础研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1623-04

乌司他丁对 A549 细胞在缺氧条件下 ENaC-α 表达影响的研究

邓 嘉,李长毅,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:研究乌司他丁对缺氧 A549 细胞 ENaC-α mRNA 和蛋白表达水平的影响。方法:将 A549 细胞分组为缺氧对照组和乌司他丁组,分别在 3%O_2 和 0%O_2 的缺氧条件下,用 1 250、2 500、5 000 U/ml 浓度乌司他丁作用 A549 细胞,用 RT-PCR 半定量 ENaC-α mRNA 表达量,用 Western blot 半定量 ENaC-α 蛋白浓度。结果:在不同缺氧程度下,乌司他丁组的 ENaC-α mRNA 和蛋白表达均高于对照组,呈浓度依赖方式。结论:乌司他丁能够对抗缺氧对 ENaC-α 表达的抑制作用,提示乌司他丁在急性肺损伤(Acute lung injury,ALI)的治疗过程中具有缓解肺水肿、减轻肺损伤的作用。

【关键词】乌司他丁;上皮钠通道;急性肺损伤;缺氧

【中国图书分类法分类号】R563.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-29

Ulinastatin inhibits the action of Hypoxia on ENaC-α mRNA and protein expression

DENG Jia, et al

(*Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of Ulinastatin on ENaC-α mRNA and protein of human alveolar epithelial A549 cells which are treated with hypoxia. *Methods*: A549 cells were divided into two groups, hypoxia group and ulinastatin group. A549 cells were treated with Ulinastatin at the doses of 1 250, 2 500 U/ml and 5 000 U/ml for 48 h when cotreated with 3% O_2 or 0% O_2. The mRNA and protein levels of ENaC-α were determined by semiquantitative RT-PCR and Western blot. *Results*: Incubation of A549 with 1 250 U/ml, 2 500 U/ml and 5 000 U/ml of Ulinastatin for 48 h could significantly upregulate the expression of ENaC-α in a concentration-dependent manner. *Conclusion*: Ulinastatin could reverse the inhibitory effect of hypoxia on the expression of ENaC-α, which suggests that ulinastatin can promote lung fluid clearance and pulmonary edema reduction.

【Key words】Ulinastatin; Epithelial sodium channel; Acute lung injury; Hypoxia

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为特征,引起肺弥散功能障碍、肺内分流和死腔样通气,从而导致肺泡缺氧。缺氧导致作为肺泡内钠离子和液体清除主要驱动力的肺泡上皮钠通道(Epithelial sodium channel,ENaC)功能障碍[1],促使肺水肿形成。缺氧和肺水肿互为因果,构成恶性循环。乌司他丁是一种从男性尿中分离纯化的尿胰蛋白酶抑制剂,具有抑制炎性介质释放和清除氧自由基等作用。它在急性肺损伤

作者介绍:邓 嘉(1981-),男,博士,
研究方向:呼吸危重症的基础和临床研究。
通讯作者:王导新,男,教授,E-mail: wangdaoxin1@163.com。

基金项目:国家自然科学基金(编号:30971303)。

associates with bone metastasis in breast carcinomas[J].Annals of Oncology,2008,19(2):308-314.

[11] Pierrick G,Fournier J and Theresa A G. BMP7:A New Bone Metastases Prevention[J]?Am J Pathol,2007,171(3):739-743.

[12] Yang S X,Chen Z,Frenkel,et al. Diverse biological effect and smad signaling of bone morphogenetic protein 7 in prostate tumor cells [J]. Cancer Res, 2005,65(13): 5769-5777.

[13] Dominik R,Haudens C, Sabrina M,et al. Bone morphogenetic protein (BMP)-6 signaling and BMP antagonist noggin in prostate cancer [J]. Cancer Res,2004,64(22):8276-8284.

[14] Tanja R,Ina P,Fabrice S,et al. Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration[J]. Cancer Res,2005,65(2): 448-456.

[15] Laurent D,Christine M,Michelle K,et al. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor[J].Circ Res,2008, 102(8):914-922.

(责任编辑:关蕴良)

(Acute lung injury, ALI)中能够抑制中性白细胞浸润和减轻肺水肿。但是有关乌司他丁促进肺水清除的具体机制尚不清楚,是否与 ENaC 的表达量变化相关,以及在缺氧等病理状态下是否也具有对 ENaC 表达的影响等问题尚待研究。因此,本实验给予人Ⅱ型肺泡上皮 A549 细胞缺氧处理后,观察乌司他丁对 ENaC-α mRNA 和蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

A549 细胞系,由本实验室保存;乌司他丁(广东天普生化医药股份有限公司);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-α 多克隆抗体购自美国 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。

1.2 细胞培养

人Ⅱ型肺泡上皮 A549 细胞培养于含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基中,放置到 37℃、5%CO_2、饱和湿度培养箱中,每天观察细胞生长情况。每 2~3 d 收集对数期生长细胞,达到 2×10^4 个/ml 细胞浓度时分瓶培养。

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,调整每孔细胞浓度为 1×10^4 个/ml,完全培养基培养 24 h 后换无血清培养液培养 24 h,按顺序分别加入浓度为 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。然后在酶标读数仪上用 492 nm 波长测定各孔吸光度(A)值,以不加乌司他丁而只含等量二甲基亚砜的孔为阴性对照,仅含培养液孔为空白对照。各试验组安排 3 个复孔,取平均值,计算细胞存活率。细胞存活率=(实验组 A 值-空白对照组 A 值)/(阴性对照组 A 值-空白对照组 A 值)×100%。实验重复 3 次,结果基本一致,依据其中一次实验值绘制细胞生存图。

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 培养基稀释乌司他丁溶液为 1 250、2 500、5 000、7 500、10 000 U/ml。实验分组:(1)对照组:无血清 RPMI1640 培养下分别在 3%O_2 和 0%O_2 两个缺氧浓度作用 48 h;(2)乌司他丁组:向无血清 RPMI-1640 培养细胞中分别加入各种浓度乌司他丁,并在 3%O_2 或 0%O_2 两个缺氧浓度下作用 48 h。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 按说明书用总 RNA 抽提试剂盒提取 A549 细胞总 RNA。用紫外分光光度计测定 RNA 浓度及其纯度。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 第一链。ENaC-α 引物:正义:5'-GCTAATGAGATTCCTGTCGCTTCCATCC-3',反义:5'-CTCTGCCCCCTTCCTTTGGTCTTCTTCC-3',片段长度 440 bp;β-actin 引物:正义:5'-CAT GAAGATCCTCACCGAGC-3',反义:5'-ACAGGACTCCATGCCCAGGA-3',片段长度 250 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-α)、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分析。用 ENaC-α PCR 与 β-actin PCR 产物条带灰度比值作为 ENaC-α mRNA 的相对表达量。

1.3.4 Western blot 按分子克隆指南提取蛋白,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,运用湿转法转移至硝酸纤维素滤膜上,用脱脂奶粉摇动封闭,分别加入 ENaC-α 兔抗人多克隆抗体(1:300)及 β-actin 兔抗人多克隆抗体(1:1 000),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。用凝胶成像仪分析结果,以 ENaC-α/β-actin 条带吸光度(A)比值作为 ENaC-α 蛋白表达的相对含量。

1.4 统计学分析

SPSS13.0 软件进行资料的分析处理,用单因素方差分析比较各暴露水平的 A549 细胞 ENaC-α mRNA 和蛋白表达水平,两样本均数间比较采用 t 检验,检验水准为 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞活性测定结果

乌司他丁浓度在 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。当作用浓度在 7 500 U/ml 和 10 000 U/ml 后,其生存率显著下降,分别为(50.4%±0.6%)和(39.1%±0.8%),细胞死亡显著增加。

2.2 乌司他丁对缺氧作用的 ENaC-α 基因在转录水平的影响

PCR 结果显示,在 3% O_2 下,1 250 U/ml 组与对照组有差异($P<0.05$),其余各实验组 ENaC-α 基因转录水平与对照组相比差异显著($P<0.01$),1 250 U/ml 组与 2 500 U/ml 组及 2 500 U/ml 组与 5 000 U/ml 组间差异均有明显差异($P<0.05$);在 0% O_2 下,1 250 U/ml 组与对照组无显著差异($P>0.05$),2 500 U/ml 组及 5 000 U/ml 组 ENaC-α mRNA 表达与对照组有显著差异($P<0.01$),各浓度组间 ENaC-α 基因转录水平差异有统计学意义($P<0.05$)(见表 1 和图 1 A、B)。

2.3 乌司他丁对缺氧作用的 ENaC-α 基因在翻译水平的影响

Western blot 结果显示,在 3% O_2 下,1 250 U/ml 组与对照组有明显差异($P<0.05$),其余各实验组 ENaC-α 蛋白与

对照组相比差异显著（$P<0.01$），1 250 U/ml 组与 2 500 U/ml 组之间有差异（$P<0.05$），2 500 U/ml 组与 5 000 U/ml 之间有显著差异（$P<0.01$）；在 0% O_2 下，1 250 U/ml 组与对照组差异不大（$P>0.05$），1 250 U/ml 组及 2 500 U/ml 组 ENaC-α 蛋白较对照组差异有统计学意义（$P<0.05$），2 500 U/ml 组与 5 000 U/ml 之间存在明显差异（$P<0.01$）（见表 2 和图 2A、B）。

表 1　在不同缺氧条件下乌司他丁对 ENaC-α 基因转录水平的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

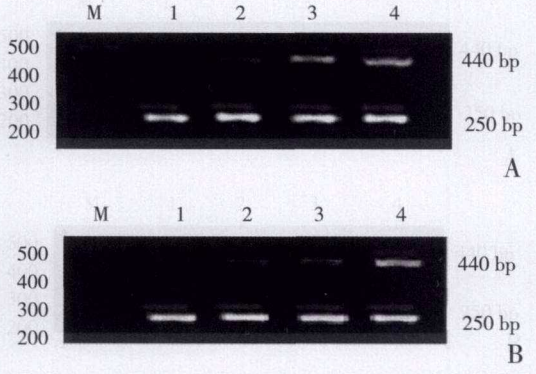
乌司他丁浓度	ENaC-α mRNA/β-actin mRNA	
	3%O_2	0%O_2
0 U/ml	0.430 ± 0.046	0.190 ± 0.040
1 250 U/ml	0.513 ± 0.021	0.220 ± 0.020※
2 500 U/ml	0.590 ± 0.030	0.303 ± 0.038
5 000 U/ml	0.667 ± 0.031	0.430 ± 0.044#

※：$P>0.05$，与 0 U/ml 相比；#：$P<0.01$，与 2 500 U/ml 相比

表 2　在不同缺氧条件下乌司他丁对 ENaC-α 基因翻译水平的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

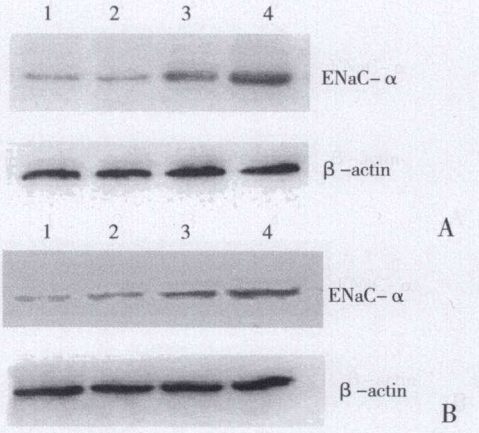
乌司他丁浓度	ENaC-α protein/β-actin protein	
	3%O_2	0%O_2
0 U/ml	0.530 ± 0.044	0.450 ± 0.046
1 250 U/ml	0.606 ± 0.035	0.496 ± 0.051#
2 500 U/ml	0.680 ± 0.031	0.598 ± 0.034
5 000 U/ml	0.820 ± 0.033※	0.706 ± 0.031△

※：$P<0.01$，与 2 500 U/ml 相比；#：$P>0.05$，与 0 U/ml 相比；△：$P<0.01$，与 2 500 U/ml 相比



A. 3%O_2；B. 0%O_2；M.Marker；1. 0 U/ml 乌司他丁组；2. 1 250 U/ml 乌司他丁组；3. 2 500 U/ml 乌司他丁组；4. 5 000 U/ml 乌司他丁组

图 1　在不同缺氧条件下乌司他丁 ENaC-α 基因转录水平的影响



A. 3%O_2；B. 0%O_2；M.Marker，1. 0 U/ml 乌司他丁组；2. 1 250 U/ml 乌司他丁组；3. 2 500 U/ml 乌司他丁组；4. 5 000 U/ml 乌司他丁组

图 2　在不同缺氧条件下乌司他丁浓度对 ENaC-α 基因翻译水平的影响

3　讨　论

大量临床研究发现，ARDS 患者如果能够越快促进肺泡水肿液的重吸收控制肺水肿，患者就能够越快从呼吸衰竭中恢复过来，从而降低死亡率；相反，如果早期没有控制肺水肿，则呼吸衰竭时间延长，死亡率升高。肺泡 ENaC 是一种广泛存在于各种组织器官中的钠离子转运的重要驱动力，在肺泡内 ENaC 主要分布于Ⅱ型肺泡上皮细胞，在肺泡液体重吸收过程中扮演重要角色。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[2]。ENaC 结构以及功能的变化与肺部的一些疾病有相关性，ENaC 基因变异引起 ENaC 蛋白功能障碍导致肺纤维囊性变[3]。ENaC 是由 α、β、γ 3 种亚基组成，3 种亚基可以构成不同的异聚体，3 种亚基的作用也各有不同。目前认为 ENaC-α 是 ENaC 的功能单位，是有效清除肺水肿必不可少的。用 siRNA 干扰 α 亚基表达发现[4]，肺泡水肿液重吸收明显减弱，两者呈剂量依赖关系，并且在缺乏 α 亚基情况下 β-肾上腺受体激动剂难以达到促进水肿液重吸收的作用。因而本实验选择了上皮钠通道 α 亚基作为研究对象，以观察乌司他丁是否具有在缺氧条件下改善肺液清除的保护性作用。

本实验中发现，随着缺氧程度的增加，ENaC-α 转录以及蛋白的表达水平进一步下降，说明缺氧显著影响上皮钠通道功能，加重肺水肿。缺氧可以从多个方面影响 ENaC 肺水清除的功能：① ENaC 主动转运水钠，这是耗能过程，需要充

足的氧供。缺氧会导致供能不足,使 ENaC 功能下降。②正常氧供在 ENaC 的转录翻译过程中也有重要作用。中度以上缺氧使 ENaC α、β、γ 3 种亚基的 mRNA 和 α 亚基的蛋白表达下降[5]。最近一项研究显示[6],在小鼠的胎儿期(3% O_2)和出生后(21%O_2)地塞米松均能够显著上调 ENaC-α 的 mRNA 表达,但仅在出生后(21%O_2)才能上调 ENaC-α 的蛋白表达,认为出生后的正常氧暴露对 ENaC-α mRNA 的有效翻译有重要影响。③缺氧状态还能促使细胞内活性氧含量升高。缺氧诱导一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)的表达合成,NO 释放增加。在支原体感染的小鼠实验中,活性氧 NO 能够明显减弱肺液清除,抑制 ENaC 功能[7]。除此之外,在体外实验中缺氧状态能诱导 A549 细胞执行调亡[8],从而影响肺泡上皮对水肿液的清除效能。

乌司他丁可能从以下几个方面对抗缺氧对 ENaC-α 转录和翻译的影响:①对抗缺氧诱导的炎症反应:乌司他丁能够对抗由细菌内毒素诱导产生的系统性炎症反应和器官损伤,抑制 IL-1、巨噬细胞趋化蛋白 -1、巨噬细胞炎症蛋白 -2 等多种炎性介质的表达[9],下调促炎性细胞因子及粘附分子的表达,影响中性粒细胞的趋化聚集和激活,控制中性白细胞激活后形成的所谓的"瀑布样"效应[10];②清除氧自由基:大量氧自由基的产生可使组织细胞发生过度的脂质过氧化反应,诱导炎性介质的转录、复制和释放,引起炎症反应和组织损伤。乌司他丁能够抑制 NOS 的表达,减少 NO 生成,通过清除氧自由基抑制内毒素诱导的急性肺损伤发生[11]。其清除氧自由基的机制为缓解对多形核白细胞膜的刺激、抑制过量超氧化物生成以及清除产生的超氧化物等[12];③抗氧化作用:血红素氧化酶系统是体内一种保护性抗氧化系统,研究发现血红素氧化酶 -1(Heme oxygenase-1,HO-1)的表达强度与 ALI/ARDS 有相关性[13],乌司他丁能够增加 HO-1 在肺组织的表达[14],发挥抗氧化作用,保护受损肺组织。

本实验中乌司他丁能够逆转缺氧对 ENaC-α mRNA 和蛋白表达的抑制作用,呈浓度依赖方式,阐明在 ALI/ARDS 缺氧状况下乌司他丁缓解肺水肿的分子机制,为乌司他丁在 ALI/ARDS 的治疗应用中提供了新的依据。但是乌司他丁到底是通过什么方式、哪条作用途径来实现以上作用的尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Jain M, Sznajder J I. Effects of hypoxia on the alveolar epithelium[J]. Proc Am Thorac Soc, 2005, 2(3): 202-205.

[2] 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(2): 777-788.

[3] Azad A K, Rauh R, Vermeulen F, et al. Mutations in the amiloride-sensitive epithelial sodium channel in patients with cystic fibrosis-like disease[J]. Hum Mutat, 2009, 30(7): 1093-1103.

[4] Li T, Folkesson H G. RNA interference for alpha-ENaC inhibits rat lung fluid absorption in vivo[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 290(4): 649-660.

[5] Plan è s C, Escoubet B, Blot-Chabaud M, et al. Hypoxia downregulates expression and activity of epithelial sodium channels in rat alveolar epithelial cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17(4): 508-518.

[6] Otulakowski G, Rafii B, Harris M, et al. Oxygen and glucocorticoids modulate alphaENaC mRNA translation in fetal distal lung epithelium[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, 34(2): 204-212.

[7] Hickman-Davis J M, McNicholas-Bevensee C, Davis I C, et al. Reactive species mediate inhibition of alveolar type Ⅱ sodium transport during mycoplasma infection[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 173(3): 334-344.

[8] Strassberg S, Godi I, Pandya D, et al. Proinflammatory mediators amplify the apoptotic response of human lung cells during hypoxia[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 169(1): 797.

[9] Inoue K, Takano H, Shimada A, et al. Urinary trypsin inhibitor protects against systemic inflammation induced by lipopolysaccharide[J]. Mol Pharmacol, 2005, 67(3): 673-680.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 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.

[13] Shiva S, Oh J Y, Lander A L, et al. Nitroxia: the pathological consequence of dysfunction in the nitric oxid-cytochrome c oxidase signaling pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2005, 38(3): 297-306.

[14] 金丽艳,徐军美,贺志飚,等.乌司他丁对油酸致急性肺损伤大鼠肺组织血红素氧化酶 -1 的影响[J].中南大学学报,2007,32(4): 675-678.

(责任编辑:关蕴良)