

[文章编号] 1000-4718(2008)03-0602-04

转化生长因子 β_1 对香烟诱导的大鼠肺泡巨噬细胞 γ -谷氨酰半胱氨酸合酶表达的影响

许建英, 安晓洁, 庞敏, 杜永成

(山西医科大学第一医院呼吸科,山西太原 030001)

[摘要] 目的:探讨转化生长因子(TGF)- β_1 对香烟诱导的大鼠肺泡巨噬细胞 γ -谷氨酰半胱氨酸合酶(γ -GCS)和活化蛋白(AP)-1亚单位 *c-fos* mRNA及其蛋白表达的影响。方法:通过支气管肺泡灌洗获取大鼠肺泡巨噬细胞,随机分为对照组、香烟组和 TGF- β_1 组。TGF- β_1 组加入终浓度为 3 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- β_1 ,2 h后除对照组外,余2组均加入香烟烟雾提取物,对照组加入磷酸盐缓冲液。分别用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和免疫细胞化学方法检测肺泡巨噬细胞中 γ -GCS(重链亚单位)及 *c-fos* mRNA和蛋白的表达。结果:香烟组 γ -GCS和 *c-fos* mRNA及其蛋白表达水平显著高于对照组(分别 $P < 0.05, P < 0.01$)。TGF- β_1 组 γ -GCS mRNA及其蛋白表达水平明显低于香烟组(均 $P < 0.01$);而 *c-fos* mRNA及其蛋白表达水平明显高于香烟组(均 $P < 0.01$)。结论:转化生长因子- β_1 参与香烟所致慢性阻塞性肺疾病肺氧化/抗氧化失衡的发病机制。

[关键词] 烟; γ -谷氨酰半胱氨酸合酶;转化生长因子 β_1 ;巨噬细胞,肺泡

[KEY WORDS] Smoke; γ -glutamylcysteine synthetase; Transforming growth factor-beta 1; Macrophages, alveolar

[中图分类号] R563.3 [文献标识码] A

氧化/抗氧化失衡在慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的发病机制中有重要作用。谷胱甘肽(GSH)作为肺最主要的抗氧化剂在肺部抗氧化损伤中发挥着重要作用。 γ -谷氨酰半胱氨酸合酶(γ -GCS)是GSH生物合成的限速酶,决定着生物体内GSH的水平。转化生长因子(TGF)- β_1 是细胞增殖和分化的多效细胞因子。近年来研究发现许多慢性炎症性肺疾病中TGF- β_1 水平的提高与氧化/抗氧化失衡相关^[1]。活化蛋白(AP)-1是氧化还原敏感的转录因子。COPD以GSH减少为特征,TGF- β_1 是其1个关键的调节因素。以前的研究显示各种细胞系中 γ -GCS在转录水平基因表达可以上调,然而迄今为止其下调的分子机制还不清楚。本研究拟探讨TGF- β_1 在 γ -GCS表达调控中的作用及其在慢性阻塞性肺疾病氧化/抗氧化失衡中的作用机制。

材 料 和 方 法

1 主要试剂

1.1 香烟烟雾提取物的制备 参照 Carp 等^[2]方法制备香烟烟雾提取物(cigarette smoke extracts, CSE)。抗大鼠 γ -GCS(重链亚单位)购自 Neomarkers 公司,抗大鼠 *c-fos* (AP-1亚单位)购自武汉博士德生物有限公司。大鼠巨噬细胞 γ -GCS及 *c-fos* mRNA RT-PCR 检测引物由北京奥科生物技术有限责任公司提供。

2 肺泡巨噬细胞的分离与纯化

雄性 Wistar 大鼠,体重 200-250 g。以 25% (800 mg/kg BW)乌拉坦腹腔注射麻醉大鼠,无菌条件下行气管插管,4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷磷酸盐缓冲液(PBS)50 mL分5次行支气管肺泡灌洗,收集灌洗液,以1 000 r/min离心10 min沉淀细胞,再用PBS洗涤细胞2次,用不完全 RPMI-1 640 培养基重悬细胞,调整细胞浓度为 $5 \times (10^8 - 10^9)$ cells/L,接种于预铺有盖玻片的6孔培养板中,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 孵箱中静置孵育1.5 h待其贴壁,PBS洗涤纯化细胞。Giemsa 染色示 >95%为肺泡巨噬细胞(AM)。将其作为研究对象。

3 分组

将细胞随机分为3组:对照组、香烟组和 TGF- β_1 组。TGF- β_1 组加入终浓度为 3 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- β_1 ,2 h后除对照组外,每组均加入香烟烟雾提取物(CSE,终浓度5%),对照组加入PBS。于不同时点收取细胞爬片及提取细胞总RNA,实验重复3次。

4 γ -GCS及 *c-Fos* 蛋白的检测

采用免疫细胞化学方法分别检测肺泡巨噬细胞中 γ -GCS及 *c-Fos* 的蛋白表达水平。 γ -GCS测定于加入CSE后20 h收取细胞爬片,I抗稀释度1:100。*c-Fos*测定于加入CSE后10 h收取细胞爬片,I抗稀释度1:100。

5 RT-PCR法检测巨噬细胞 γ -GCS及 *c-fos* mRNA 的表达

[收稿日期] 2006-09-13 [修回日期] 2006-12-11

E-mail: xujy@tom.com

分别于 10 h 和 5 h 提取肺泡巨噬细胞总 RNA,用于 γ -GCSH 和 *c-fos* mRNA 的检测。鉴定总 RNA 完整性及纯度后,逆转录为相应的互补脱氧核糖核酸(cDNA),条件为 42 °C 水浴 50 min, 98 °C 变性,灭活 5 min。取反转录产物 10 μ L 进行 PCR 反应,分别检测肺泡巨噬细胞中 γ -GCSH 及 *c-fos* mRNA 的表达。 γ -GCSH 引物 5'-TGC AAA CCA TCC TGA CTA CAA G-3', 5'-GGT CTT CAC AGC GTC TGA GTG-3' (产物为 237 bp); *c-fos* 引物 5'-CAG CCT TTC CTA CTA CCA TT-3', 5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3' (产物为 271 bp)。以 GAPDH 5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3', 5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3' (产物片段为 497 bp) 和 β -actin 5'-GAT GGT GGG TAT GGG TCA GAA GGA C-3', 5'-GCT CAT TGC CGA TAG TGA CCT-3' (产物片段为 630 bp) 为内参照。 γ -GCSH 扩增条件为 94 °C 5 min, 94 °C 50 s, 60 °C 50 s, 72 °C 60 s, 共 30 个循环, 最后 72 °C 10 min, 4 °C 保存。*c-fos* 扩增条件为 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 50 °C 60 s, 72 °C 60 s, 共 32 个循环, 最后 68 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

6 结果判断

肺泡巨噬细胞 γ -GCSH 及 *c-Fos* 蛋白阳性表达均为细胞胞浆内出现棕黄色颗粒。结果观察:每张细胞片随机选取 3 个 40 \times 10 高倍视野,检测这 3 个高倍视野细胞胞浆吸光度的平均值作为该切片的吸光度值。2000 医学图像分析系统(四川大智胜软件股份有限公司)检测每个视野肺泡巨噬细胞的平均吸光度值。

凝胶成像分析仪测定 γ -GCSH 和 *c-fos* mRNA 表达水平,进行各条带平均灰度(A)分析,以目的条带的 A 值与内参照 A 值比值表示待测 mRNA 相对表达量。

7 统计学处理

用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间显著性检验采用方差分析 SNK *q* 检验。

结 果

1 肺泡巨噬细胞 γ -GCSH mRNA 及其蛋白表达水平

香烟组 γ -GCSH mRNA 及其蛋白表达水平明显高于对照组 ($P < 0.01$)。TGF- β_1 组肺泡巨噬细胞 γ -GCSH mRNA 及其蛋白表达水平明显低于香烟组 ($P < 0.01$),见表 1、图 1 及图 2。

表 1 肺泡巨噬细胞 γ -GCSH、*c-fos* mRNA 及蛋白检测结果比较

Tab 1 Comparison of the expression of AM γ -GCSH and *c-fos* mRNA and protein in three group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Group	γ -GCSH		<i>c-fos</i> mRNA	<i>c-Fos</i> Protein
	mRNA	Protein		
Control	0.387 \pm 0.001	0.163 \pm 0.019	0.601 \pm 0.000	0.341 \pm 0.054
CSE	0.719 \pm 0.003 **	0.586 \pm 0.021 **	0.637 \pm 0.005 *	0.705 \pm 0.345 **
TGF- β_1	0.361 \pm 0.007 * $\Delta\Delta$	0.402 \pm 0.002 ** $\Delta\Delta$	1.243 \pm 0.004 ** $\Delta\Delta$	1.121 \pm 0.124 ** $\Delta\Delta$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs CSE group.

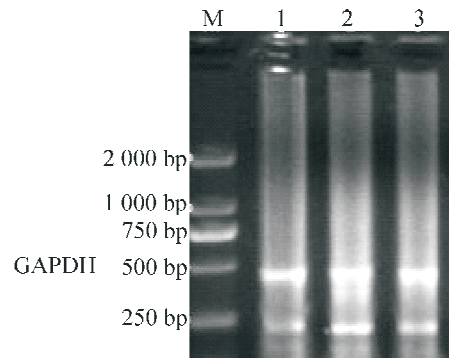


Fig 1 Electrophoretogram of γ -GCSH mRNA RT-PCR (237 bp). M: marker; 1: control group; 2: CSE group; 3: TGF- β_1 group.

图 1 γ -GCSH RT-PCR 产物凝胶电泳(237 bp)

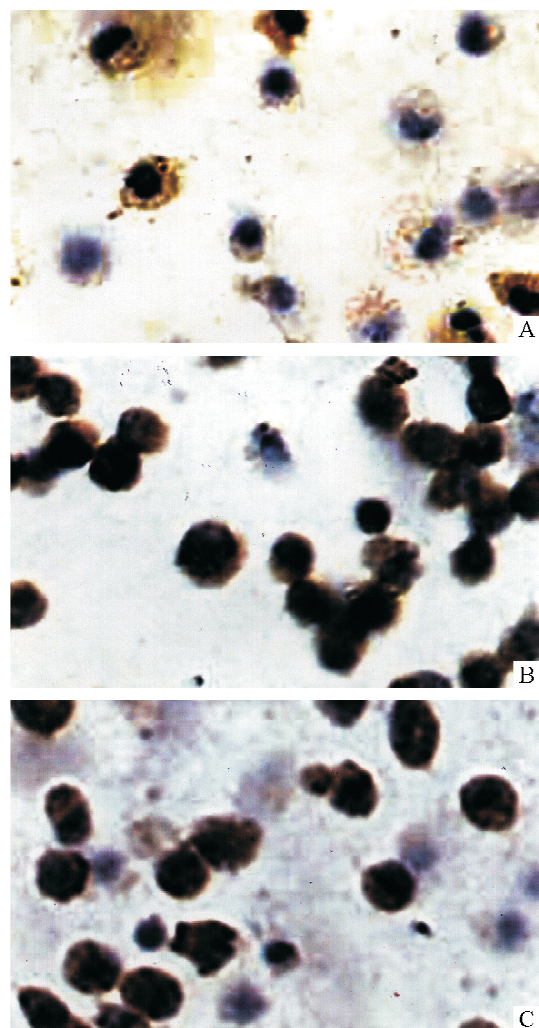


Fig 2 The expression of γ -GCSH protein in alveolar macrophage in three groups (immunocytochemistry, DAB \times 400). A: γ -GCS protein in alveolar macrophage was weakly expressed in control group; B: γ -GCS protein in alveolar macrophage was strongly expressed in CSE group; C: γ -GCS protein in alveolar macrophage was lowly expressed in TGF- β_1 group than that in CSE group.

图 2 3 组大鼠肺泡巨噬细胞 γ -GCS 表达

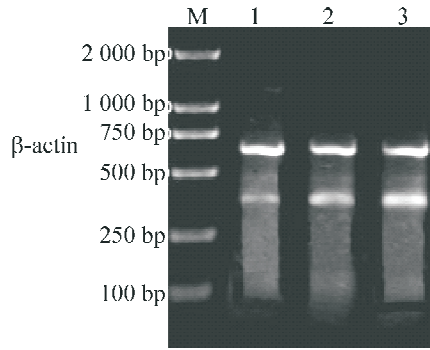


Fig 3 Electrophoretogram of *c-fos* mRNA RT-PCR (371 bp). M: marker; 1: control group; 2: CSE group; 3: TGF- β_1 group.

图3 *c-fos* RT-PCR 产物凝胶电泳(371 bp)

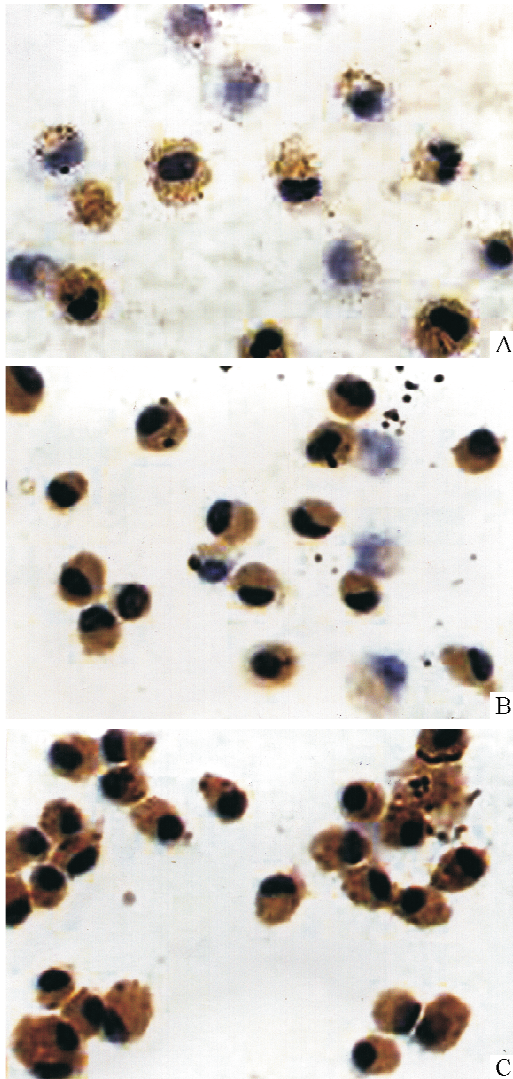


Fig 4 The expression of *c-Fos* protein in alveolar macrophage in three groups (immunocytochemistry, DAB $\times 400$). A: *c-Fos* protein in alveolar macrophage was weakly expressed in control group; B: *c-Fos* protein in alveolar macrophage was strongly expressed in CSE group; C: *c-Fos* protein in alveolar macrophage was highly expressed in TGF- β_1 group than that in CSE group.

图4 3组大鼠肺泡巨噬细胞 *c-Fos* 蛋白表达

2 肺泡巨噬细胞 *c-fos* mRNA 及其蛋白表达水平

香烟组 *c-fos* mRNA 及其蛋白表达水平明显高于对照组 (分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$)。TGF- β_1 组肺泡巨噬细胞 *c-fos* mRNA 及其蛋白表达水平明显低于香烟组 ($P < 0.01$), 见表1、图3及图4。

讨 论

吸烟是 COPD 的主要危险因素之一^[3]。香烟烟雾诱导的氧化/抗氧化失衡对 COPD 的发生、发展及恶化均有促进作用。GSH 是肺部重要的抗氧化剂。 γ -GCS 是 GSH 生物合成的限速酶。体外培养的气道上皮细胞暴露于香烟烟雾提取物中 12-24 h γ -GCS mRNA 表达增加^[4], 同时也发现上调 γ -GCS 基因表达发生在转录水平。 γ -GCS mRNA 转录调控的增强是依靠对氧化还原反应敏感的转录因子 AP-1 的活化来实现的^[5]。TGF- β_1 主要定位于支气管、肺泡上皮细胞及肺泡巨噬细胞。氧化应激可以激活 TGF- β_1 。TGF- β_1 mRNA 的水平与吸烟史和气道阻塞的程度有肯定关系。TGF- β_1 是 GSH 合成强有力的抑制因子, 而且这种抑制作用至少在一定程度上是通过对 γ -GCS 编码基因转录过程的调控来实现的。TGF- β_1 可导致 GSH 和 γ -GCS 活性以剂量和时间依赖方式降低, 且减少 γ -GCS mRNA 的表达, 导致细胞内 ROS (活性氧) 的水平提高。TGF- β_1 在 24 h 可以最大程度地抑制 γ -GCS mRNA 基因的表达^[1]。

本实验结果显示, 经 TGF- β_1 预处理后香烟诱导的大鼠肺泡巨噬细胞 γ -GCS mRNA 及其蛋白表达较香烟组表达明显降低, 与文献报道一致。Uria 等^[6]学者认为 TGF- β_1 降低 γ -GCS 的表达是通过 AP-1 机制完成的。在本实验也观察到, 经 TGF- β_1 预处理后香烟诱导的大鼠肺泡巨噬细胞 *c-fos* mRNA 及其蛋白表达水平较香烟组明显升高。认为 TGF- β_1 降低 γ -GCS 表达的可能机制是: 香烟烟雾中的氧化剂活化了氧化还原敏感的转录因子 AP-1 c-Fos 亚单位, 使之随后与 γ -GCS 2 个亚单位的 5' 端启动子区 AP-1 位点结合, 从而活化保护性抗氧化基因 γ -GCS, 增加 GSH, 提高抗氧化能力来降低香烟引起的氧化性损伤, 而同时和氧化剂活化的 *c-Fos* 与 TGF- β_1 -365 启动子片段高亲和力的 AP-1 位点结合, 诱导了 TGF- β_1 的活化, 加重了肺部的氧化应激, 造成了肺部的损伤。由此, 在氧化应激造成损伤的早期, 机体努力通过自身的抗氧化物质维持机体氧化/抗氧化系统处于平衡中。而促氧化剂 TGF- β_1 本身可加重氧化应激, 氧化应激又进一步激活 AP-1, 促进了 TGF- β_1 的产生, 这样周而复始, 产生恶性循环, 使机体中的 AP-1 和促氧化剂 TGF- β_1 过量表达, 而过量表达的 *c-Fos* 对 γ -GCS 基因表达有抑制作用, 降低其产生, 从而降低保护性抗氧化基因 GSH 的合成, 造成机体的氧化损伤。

综上所述, TGF- β_1 可通过上调香烟诱导的肺泡巨噬细胞 *c-fos* mRNA 及其蛋白的表达, 降低 γ -GCS mRNA 及其蛋白的表达。提示慢阻肺氧化/抗氧化发病机制中有 TGF- β_1 的参与, 它可能是通过降低 γ -GCS 的表达来发挥其在 COPD 氧化应激中作用的。

(下转第 621 页)

- targeting of ligand and receptor for regulation of cellular metabolism[J]. *J Biol Chem*, 2002,277(47): 45249 - 45258.
- [8] Honda S, Kashiwagi M, Ookata K, et al. Regulation by 1 α ,25 - dihydroxyvitamin D(3) of expression of stanniocalcin messages in the rat kidney and ovary[J]. *FEBS Lett*,1999, 459(1):119 - 122.
- [9] Serlachius M, Andersson LC. Upregulated expression of stanniocalcin - 1 during adipogenesis[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 296(2):256 - 264.
- [10] Wong CK, Yeung HY, Mak NK, et al. Effects of dibutyl cAMP on stanniocalcin and stanniocalcin - related protein mRNA expression in neuroblastoma cells[J]. *J Endocrinol*, 2002, 173(1):199 - 209.
- [11] Deol HK, Varghese R, Wagner GF, et al. Dynamic regulation of mouse ovarian stanniocalcin expression during gestation and lactation [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(9): 3412 - 3421.
- [12] Bouras T, Southey MC, Chang AC, et al. Stanniocalcin 2 is an estrogen - responsive gene coexpressed with the estrogen receptor in human breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2002,62(5):1289 - 1295.
- [13] Wu S, Yoshiko Y, De Luca F. Stanniocalcin 1 acts as a paracrine regulator of growth plate chondrogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(8):5120 - 5127.
- [14] Yoshiko Y, Aubin JE. Stanniocalcin 1 as a pleiotropic factor in mammals[J]. *Peptides*, 2004, 25(10):1663 - 1669.
- [15] Zlot C, Ingle G, Hongo J, et al. Stanniocalcin 1 is an autocrine modulator of endothelial angiogenic responses to hepatocyte growth factor [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(48): 47654 - 47659.
- [16] Filvaroff EH, Guillet S, Zlot C, et al. Stanniocalcin 1 alters muscle and bone structure and function in transgenic mice[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(9):3681 - 3690.
- [17] Yeung HY, Lai KP, Chan HY, et al. Hypoxia - inducible factor - 1 - mediated activation of stanniocalcin - 1 in human cancer cells[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(11): 4951 - 4960.
- [18] Chang AC, Cha J, Koentgen F, et al. The murine stanniocalcin 1 gene is not essential for growth and development [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(23):10604 - 10610.
- [19] McCudden CR, Majewski A, Chakrabarti S, et al. Co - localization of stanniocalcin - 1 ligand and receptor in human breast carcinomas [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 213(2):167 - 172.
- [20] Yahata K, Mori K, Mukoyama M, et al. Regulation of stanniocalcin 1 and 2 expression in the kidney by klotho gene [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 310(1):128 - 134.
- [21] Kanellis J, Bick R, Garcia G, et al. Stanniocalcin - 1, an inhibitor of macrophage chemotaxis and chemokinesis [J]. *Am J Physiol*, 2004, 286(2):F356 - F362.
- [22] Serlachius M, Alitalo R, Olsen HS, et al. Expression of stanniocalcin - 1 in megakaryocytes and platelets[J]. *Br J Haematol*, 2002, 119(2):359 - 363.
- [23] Eisenhofer G, Huynh TT, Pacak K, et al. Distinct gene expression profiles in norepinephrine - and epinephrine - producing hereditary and sporadic pheochromocytomas: activation of hypoxia - driven angiogenic pathways in von Hippel - Lindau syndrome [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2004,1(4):897 - 911.
- [24] Tohmiya Y, Koide Y, Fujimaki S, et al. Stanniocalcin - 1 as a novel marker to detect minimal residual disease of human leukemia[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2004, 204(2): 125 - 133.
- [25] Chang AC, Jellinek DA, Reddel RR. Mammalian stanniocalcins and cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2003,10(3):359 - 373.

(上接第 604 页)

[参 考 文 献]

- [1] Jardine H, MacNee W, Donaldson K, et al. Molecular mechanism of transforming growth factor β_1 induced glutathione depleting in alveolar epithelial cells. Involvement of AP - 1/ARE and Fra - 1 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(24):21158 - 21166.
- [2] Carp H, Janoff A. Possible mechanisms of emphysema in smokers. *In vitro* suppression of serum elastase - inhibitory capacity by fresh cigarette smoke and its prevention by anti-oxidants[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1978, 118(3):617 - 621.
- [3] 李亚清, 张珍祥, 徐永健, 等. 香烟提出物对被动吸烟大鼠肺泡巨噬细胞源性明胶酶的表达和酶活性的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(5): 948 - 952.
- [4] Rahman I, Bel A, Mulier B, et al. Transcriptional regulation of gamma - glutamylcysteine synthetase - heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 229(3): 832 - 837.
- [5] Rahman I, Smith CA, Antonicelli F, et al. Characteration of gamma - glutamylcysteine synthetase - heavy subunit gene promoter: critical role for AP - 1 [J]. *FEBS Lett*, 1998;427(1):129 - 133.
- [6] Uria JA, Jimenez MG, Balbin M, et al. Differential effects of transforming growth factor - β on the expression of collagenase - 1 and collagenase - 3 in human fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(16):9769 - 9777.