

[文章编号] 1000- 4718(2005)04- 0776- 04

# 胰蛋白酶可诱导肺上皮细胞分泌单核 细胞趋化蛋白- 1\*

王海燕, 何韶衡<sup>△</sup>

(汕头大学医学院变态反应学与炎症学研究所, 广东 汕头 515031)

**[摘要]** 目的: 探讨胰蛋白酶对人上皮细胞单核细胞趋化蛋白- 1(MCP- 1)分泌的影响。方法: 人肺上皮细胞系 A549 细胞分别接种于 12 孔培养板各孔内, 并分别用不同浓度的胰蛋白酶和/或胰蛋白酶抑制剂进行刺激。刺激时间为 2 h、8 h 和 16 h。用 ELISA 方法检测上清液中的 MCP- 1 水平。结果: 经过 16 h 的培养, 胰蛋白酶可引起浓度相关性 MCP- 1 释放高于基础量, 胰蛋白酶在浓度 3  $\mu\text{g}/\text{L}$  时就可引起 MCP- 1 的释放量增加, 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  时诱导 MCP- 1 的释放量达高峰, 为基础分泌量的 3 倍, 胰蛋白酶浓度增加到 300  $\mu\text{g}/\text{L}$  时, MCP- 1 的释放量反而下降。大豆胰蛋白酶抑制剂可以抑制胰蛋白酶对 MCP- 1 的释放作用。时间相关曲线表明, 胰蛋白酶从 2 h 起即可引起 MCP- 1 释放, 16 h 达高峰。结论: 胰蛋白酶可促进人肺上皮细胞分泌 MCP- 1, 大豆胰蛋白酶抑制剂可抑制此作用。

[关键词] 胰蛋白酶; 上皮细胞; 单核细胞化学吸收蛋白质 1

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Induction of monocyte chemoattractant protein- 1 secretion from lung epithelial cells by trypsin

WANG Hai- yan, HE Shao- heng

(Allergy and Inflammation Research Institute, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the actions of trypsin on the secretion of monocyte chemoattractant protein- 1 (MCP- 1) from human lung epithelial cells. **METHODS:** A549 cells were cultured in a 12- well culture plate. The challenge was performed by addition of various concentrations of trypsin or trypsin inhibitor into each well, respectively. After 2 h, 8 h or 16 h, the reactions were terminated by removal of the supernatant from each well. A sandwich ELISA was used to determine the levels of MCP- 1 in supernatants. **RESULTS:** Following 16 h incubation, trypsin was able to induce concentration- dependent secretion of MCP- 1. As low as 3  $\mu\text{g}/\text{L}$  trypsin was able to induce MCP- 1 release from epithelial cells, and the maximum of accumulated release of MCP- 1 was observed with 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  trypsin, which was 3 fold more than baseline release. However, trypsin at 300  $\mu\text{g}/\text{L}$  did not induce significant MCP- 1 secretion. Soybean trypsin inhibitor (SBTI) inhibited trypsin- induced MCP- 1 secretion, but  $\alpha_1$ - antitrypsin ( $\alpha_1$ - AT) did not. The time course showed that the actions of trypsin initiated at 2 h and reached their peak at 16 h. **CONCLUSION:** Trypsin is a potent secretagogue of MCP- 1 release from cultured human lung epithelial cells, and its action can be inhibited by SBTI.

[KEY WORDS] Trypsin; Epithelial cells; Monocyte chemoattractant protein- 1

胰蛋白酶主要由胰腺分泌, 过去一直认为其在体内主要参与肠道消化功能。最近研究表明, 胰蛋白酶还是蛋白酶激活受体 (proteinase activated receptors, PAR)- 2 的激活剂, 通过激活 PAR- 2, 它积极参与体内的一些生理和病理过程, 如参与细胞因子的

释放、炎症反应、血管舒张与收缩调节、气道保护、疼痛、调节消化道和皮肤的功能等<sup>[1]</sup>。呼吸道上皮细胞 PAR- 2 的激活可导致基质金属蛋白酶 (MMP- 9)<sup>[2]</sup>、粒细胞- 巨噬细胞集落刺激因子 (GM- CSF)<sup>[3,4]</sup>、酸性粒细胞趋化因子<sup>[4]</sup>、前列腺素 E<sub>2</sub>

[收稿日期] 2004- 06- 18 [修回日期] 2004- 10- 08

\* [基金项目] 李嘉诚基金资助项目 (No. C0200001)

<sup>△</sup>通讯作者 Tel: 0754- 8900405; E- mail: shaohenghe@ hotmail.com

(PGE<sub>2</sub>)、白细胞介素(IL)-6和IL-8等<sup>[5]</sup>细胞因子的释放,提示PAR-2可能参与肺部炎症。单核细胞趋化蛋白(monocyte chemoattractant protein, MCP)-1属趋化因子CC亚家族中的一员,主要由上皮细胞、单核细胞、成纤维细胞等细胞产生,可以趋化、激活T细胞和单核细胞,激活碱性粒细胞<sup>[11,12]</sup>,参与炎症过程。因此,本研究利用人肺癌上皮细胞系A549细胞探讨胰蛋白酶对上皮细胞MCP-1分泌的影响。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

胰蛋白酶、大豆胰蛋白酶抑制剂(SBTI)、 $\alpha_1$ 抗胰蛋白酶( $\alpha_1$ -AT)、钙离子导入剂calcium ionophore(CI)、青、链霉素购于Sigma公司,DMEM培养液、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶-EDTA消化液均购自Gibco公司。

### 2 方法

**2.1 细胞培养** 人肺癌上皮细胞系A549细胞(购自中国科学院上海细胞研究所)接种于50 mL培养瓶内,用DMEM完全培养液(含10% FBS、 $1 \times 10^5$  U/L青霉素和100 mg/L链霉素),于37 °C 5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

**2.2 上皮细胞激发实验** 待细胞铺满瓶底后,用0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液消化,将获得的细胞分种于12孔培养板各孔内,用1 mL完全培养液培养至细胞相互融合后,换无血清培养液培养16 h。激发实验时向每孔的细胞内加入不同浓度的胰蛋白酶和/或胰蛋白酶抑制剂,胰蛋白酶抑制剂和胰蛋白酶加入细胞前在冰上孵育30 min,细胞培养适当的时间(2 h、8 h、16 h)后完成,全部实验为双样。收集细胞上清液,离心后于-80 °C冻存。每组实验均重复5次。

**2.3 细胞上清人MCP-1水平检测** 用人MCP-1 ELISA检测试剂盒(Biosource),检测细胞上清液中的MCP-1水平,并用酶标仪于450 nm波长处测定吸光度(A)。

### 3 统计学处理

全部统计分析均采用SPSS 11.0版软件分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。*t*检验用于组间均数比较。

## 结 果

### 1 胰蛋白酶对肺上皮细胞系MCP-1释放的影响

经过16 h的培养,胰蛋白酶可引起浓度相关性

MCP-1释放增加,胰蛋白酶在浓度3  $\mu$ g/L时就可引起MCP-1释放量增加,100  $\mu$ g/L时诱导MCP-1的释放量达高峰,为基础分泌量的3倍,但当胰蛋白酶浓度增加到300  $\mu$ g/L时,MCP-1的释放量反而下降。钙离子导入剂不能诱导上皮细胞释放MCP-1(图1)。

时间关系曲线显示,胰蛋白酶引起A549细胞分泌MCP-1的聚集量从2 h起就有所增加,16 h增加最显著(图2)。

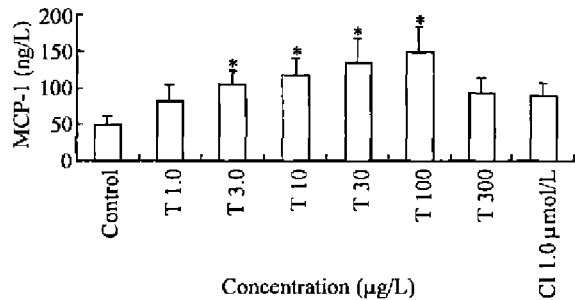


Fig 1 Effect of trypsin (T) on the release of MCP-1 from A549 cells. Cells were incubated with trypsin for 16 h.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . \*  $P < 0.05$  vs control (Student's *t* test).

图1 胰蛋白酶对A549细胞MCP-1释放的影响

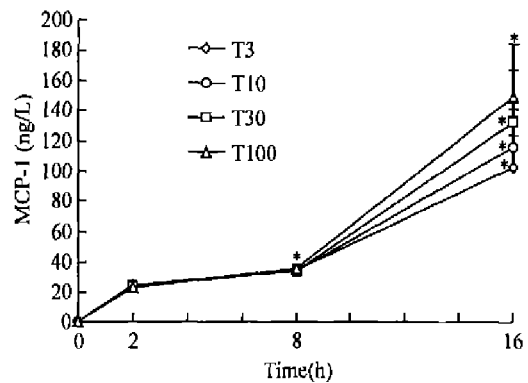


Fig 2 Time course for MCP-1 release induced by trypsin (T,  $\mu$ g/L).  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . \*  $P < 0.05$  vs the MCP-1 released at the previous time point (Student's *t* test).

图2 胰蛋白酶引起MCP-1释放的时间关系曲线

### 2 胰蛋白酶抑制剂对胰蛋白酶释放MCP-1的抑制作用

蛋白酶抑制剂和胰蛋白酶与A549细胞共同培养16 h后结果显示:SBTI在浓度为10 mg/L和30 mg/L时可分别抑制胰蛋白酶刺激A549细胞释放MCP-1的作用(图3)。 $\alpha_1$ -AT在浓度为10 mg/L和30 mg/L时可诱导上皮细胞分泌MCP-1(表1),但却不能抑制胰蛋白酶引起的MCP-1释放(图4)。

表 1  $\alpha_1$ -AT 对 MCP-1 分泌的影响

Tab 1 Effect of  $\alpha_1$ -AT on MCP-1 secretion ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Compound (mg/L)	MCP-1 (ng/L)
Medium alone	24.1 $\pm$ 1.7
$\alpha_1$ -AT 10	29.5 $\pm$ 1.8*
$\alpha_1$ -AT 30	29.7 $\pm$ 1.5*

\*  $P < 0.05$  vs medium alone.

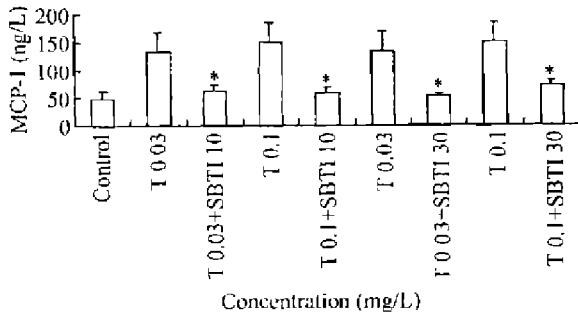


Fig 3 Effect of soybean trypsin inhibitor (SBTI) on the release of MCP-1 from A549 cells induced by trypsin (T). Cells were incubated with trypsin and SBTI for 16 h. Data are expressed as  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . \*  $P < 0.05$  vs corresponding trypsin alone (Student's *t* test).

图 3 SBTI 对胰蛋白酶激发 A549 细胞释放 MCP-1 的影响

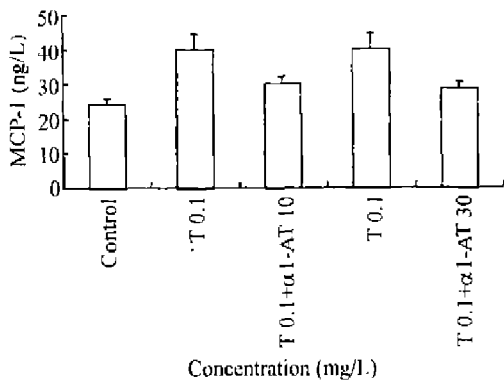


Fig 4 Effects of  $\alpha_1$ -antitrypsin ( $\alpha_1$ -AT) on the release of MCP-1 from A549 cells induced by trypsin (T). Cells were incubated with trypsin and  $\alpha_1$ -AT for 16 h.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ .

图 4  $\alpha_1$ -AT 对胰蛋白酶诱导 A549 细胞释放 MCP-1 的影响

### 讨 论

PARs 属 G 蛋白耦联受体家族中的亚类, 目前有 PAR-1 2 3 4 4 个成员组成, 它的 N 末端可被丝氨酸蛋白酶裂解而成为一个新的可自我激活的系锁配体。激活 PAR-2 的蛋白酶主要有胰蛋白酶、肥大细胞类胰蛋白酶及凝血因子 VIIa、Xa<sup>[8,9]</sup>。PAR-2 可表达在人呼吸上皮细胞和多种呼吸上皮细胞表面<sup>[3-5,10,11]</sup>。

胰蛋白酶在体内由胰腺和胰腺外器官的上皮细胞分泌, 很多胰腺外的细胞包括气道上皮细胞和 A549 细胞系也表达胰蛋白酶原。胰蛋白酶在人 PAR-2 的 R<sup>34</sup>↓S<sup>35</sup>LIGKV 处切断受体的 N 末端暴露系锁配体 SLIGKV, 从而激活 PAR-2 参与肺部炎症<sup>[12]</sup>, 而 PAR-2 的缺乏可以降低气道炎症反应<sup>[13]</sup>。

胰蛋白酶对呼吸道上皮细胞 MCP-1 分泌的促进作用表明在肥大细胞分泌的类胰蛋白酶和呼吸道上皮细胞之间存在着直接的联系, 又一次间接证明了肥大细胞在哮喘和慢性阻塞性肺疾病的发病过程中起着一定的作用。

胰蛋白酶可引起肺上皮细胞高达 3 倍的 MCP-1 释放, 表明蛋白酶对 MCP-1 的释放促进作用是有效的。蛋白酶除了能够水解组织中的特异性底物外, 还可以通过 PAR-2 受体刺激细胞分泌促炎介质, 从而加重炎症的发展, 为进一步理解炎症性介质间的相互作用提供了新的思路。胰蛋白酶活性抑制剂 SBTI 可以抑制胰蛋白酶对 MCP-1 的释放作用, 表明胰蛋白酶的作用是通过其水解活性实现的, 也表明胰蛋白酶抑制剂可能有抗炎作用。 $\alpha_1$  抗胰蛋白酶对胰蛋白酶诱导 MCP-1 释放的抑制作用无显著性, 这可能与  $\alpha_1$  抗胰蛋白酶本身可引起上皮细胞释放 MCP-1 有关。

从时间关系曲线上看, 胰蛋白酶对 MCP-1 分泌的刺激作用是一个比较缓慢的过程, 这可能表明分泌出的 MCP-1 是由上皮细胞新合成的, 而不是原有贮存的 MCP-1 的单纯释放。但具体分泌机制还有待进一步研究。

### [参 考 文 献]

[1] Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, et al. Proteinase-activated receptors[J]. Pharmacol Rev, 2001, 53(2): 245-282.

[2] Vliagoftis H, Schwingshackl A, Milne CD, et al. Proteinase-activated receptor-2-mediated matrix metalloproteinase-9 release from airway epithelial cells[J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 106(3): 537-545.

[3] Vliagoftis H, Befus D, Hollenberg MD, et al. Airway epithelial cells release eosinophil survival-promoting factors (GM-CSF) after stimulation of proteinase-activated receptor 2[J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 107(4): 679-685.

[4] Sun G, Stacey MA, Schmidt M, et al. Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells[J]. J Immunol, 2001,

- 167(2): 1014– 1021.
- [ 5] Asokanathan N, Graham PT, Fink J, et al. Activation of protease- activated receptor ( PAR) - 1, PAR- 2, and PAR - 4 stimulates IL- 6, IL- 8, and prostaglandin E<sub>2</sub> release from human respiratory epithelial cells[ J]. J Immunol, 2002, 168( 7) : 3577– 3585.
- [ 6] Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, et al. Monocyte chemoattractant protein- 1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes[ J]. J Immunol, 1992, 148( 8) : 2423– 2428.
- [ 7] Baggiolini M, Dahinden CA. CC chemokines in allergic inflammation[ J]. Immunol Today, 1994, 15( 3) : 127– 133.
- [ 8] Molino M, Barnathan ES, Numerof R, et al. Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR- 2[ J]. J Biol Chem, 1997, 272( 7) : 4043– 4049.
- [ 9] O' Brien PJ, Molino M, Kahn M, et al. Protease activated receptors: theme and variations[ J]. Oncogene, 2001, 20( 13) : 1570– 1581.
- [ 10] Cocks TM, Fong B, Chow JM, et al. A protective role for protease- activated receptors in the airways[ J]. Nature, 1999, 398( 6723) : 156– 160.
- [ 11] Miotto D, Hollenberg MD, Bunnett NW, et al. Expression of protease activated receptor- 2 ( PAR- 2) in central airways of smokers and non- smokers[ J]. Thorax, 2002, 57( 2) : 146 – 151.
- [ 12] Vergnolle N, Wallace JL, Bunnett NW, et al. Protease- activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain [ J]. Trends Pharmacol Sci, 2001, 22( 3) : 146– 152.
- [ 13] Lindner JR, Kahn ML, Coughlin SR, et al. Delayed onset of inflammation in proteinase- activated receptor- 2- deficient mice[ J]. J Immunol, 2000, 165( 11) : 6504– 6510.

## 《中华现代眼科学杂志》《中华现代皮肤科学杂志》征稿

《中华现代眼科学杂志》《中华现代皮肤科学杂志》为中华临床医学学会主办的医学专业学术刊物,月刊,具有 ISSN/ CN 标准刊号。现已被中华首席医学网(www. shouxi. net), 全文收录。国内外读者可以在网上免费阅读杂志全文。两刊贯彻党和国家的卫生工作方针政策,反映我国临床科研工作的重大进展,促进国内外学术交流,刊登眼科学、皮肤科学领域的科研成果和临床诊治经验、学术研究、技术改进、以及对临床有指导作用的专家评论,等。

《中华现代眼科学杂志》主要栏目:论著、综述、临床医学、中西医结合、中医中药(专科经方验方)、新技术、新材料、专题讲座、技术与方法、学术动态、国外研究进展、病例报告、误诊分析、经验交流、流行病学与人群防治、基层园地、保健知识讲座、专科检查与临床、药物与临床、专科护理等。

《中华现代皮肤科学杂志》主要栏目:论著、综述、基础研究、临床与病理、美容外科、临床医学、中西医结合、中医中药、药物与临床、检验与临床、经验交流、病例报告、误诊分析、技术改进、预防医学、临床护理、医学教育、调查报告、会议纪要等。

两刊发表周期短,免收审稿费。论文发表后颁发论文证书。对省/部级以上部门科研基金资助项目的论文优先刊登。欢迎投稿!

来稿请寄:北京 100035- 55 信箱编辑部 收(来稿请注明所投杂志名称)

邮编: 100035 电话: 010- 62245829, 62242528

电子邮件:《中华现代眼科学杂志》 yanxue@ sohu. com

《中华现代皮肤科学杂志》 pifuke@ sohu. com