

血管活性肠肽和表皮生长因子对支气管上皮细胞 与嗜酸性粒细胞黏附功能的影响

李翔¹, 邢秀梅¹, 张坚松^{1,*}, 谭宇蓉²

(1. 湖南师范大学医学院应用生理研究室, 长沙 410006; 2. 中南大学湘雅医学院生理学系, 长沙 410078)

[摘要] 目的: 观察肺内调节肽对嗜酸性粒细胞(EOS)与支气管上皮细胞(BEC)黏附功能的影响。方法: 选择血管活性肠肽(VIP)和表皮生长因子(EGF)两种调节肽作为研究对象, 观察它们对BEC白细胞介素(ILs)分泌及细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达的影响。结果: VIP、EGF可使O₃应激的BEC分泌ILs能力下降, 并下调气道上皮ICAM-1的表达。结论: VIP、EGF抑制BEC与EOS的黏附, 对气道炎症起负性调节作用, 有利于减轻局部的损伤。

[关键词] 肺内调节肽; 血管活性肠肽; 表皮生长因子; 支气管上皮细胞; 嗜酸性粒细胞
[中图分类号] R332.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2006)05-0772-04

Effect of vasoactive intestinal peptide and epidermal growth factor on the adhesion of eosinophils to bronchial epithelial cells

LI Xiang¹, XING Xiu-mei¹, ZHANG Jian-song^{1,*}, TAN Yu-rong²

(1. Research Department of Applied Physiology, Medical College, Hunan Normal University, Changsha 410006;
2. Department of Physiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of intrapulmonary regulatory peptides on adhesion of eosinophils (EOS) to bronchial epithelial cells (BECs). **Methods** Two regulatory peptides, namely vasoactive intestinal peptide (VIP) and epidermal growth factor (EGF) were investigated. VIP and EGF were observed on the secretion of ILs and expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). **Results** VIP and EGF could decrease ILs secretion and ICAM-1 expression. **Conclusion** VIP and EGF inhibited the adhesion of EOS to BEC in the inflammatory process to lighten the airway inflammation.

Key words: intrapulmonary regulatory peptides; vasoactive intestinal peptide; epidermal growth factor; bronchial epithelial cells; eosinophil

[J Cent South Univ (Med Sci), 2006, 31(5):0772-04]

支气管上皮细胞(bronchial epithelial cell, BEC)常经受多种应激刺激, 气道上皮不仅是应激刺激的靶细胞, 还可充当传递损伤或炎症信号的前炎症细胞。BEC受刺激后, 可通过表达黏附分子、释放多种细胞因子、吸引和募集中性粒细胞(polymorphonuclear, PMN)和嗜酸性粒细胞(eosino-

phil, EOS)等多种炎症反应细胞在局部浸润, 产生炎症反应。BEC传递炎症损伤信号可能受到肺内调节肽的调节作用, 一些调节肽如血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)起抑制炎症反应的作用^[1]。本研究通过测定BEC白细胞介素(inter-

*收稿日期 2006-01-14

作者简介 李翔(1977-), 男, 湖南常德人, 助教, 硕士研究生, 主要从事呼吸系统疾病的基础研究。

* 通讯作者, E-mail: jwc_zjs@126.com

leukin, ILs) 的分泌及 ICAM-1 的表达, 观察两种调节肽的调节作用及机制, 旨在初步探讨肺内调节肽在炎症发生发展中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材料与实验动物

新西兰兔, 购自中南大学实验动物中心 (1.5 ± 0.3) kg, 雌雄不拘。RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶、VIP、EGF、青/链霉素、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 均为美国 Sigma 公司产品; 小鼠抗兔 ICAM-1 抗体购自北京中山生物技术有限公司; 免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; 臭氧发生器系湖南有色金属研究院生产; 723 型可见分光光度计系上海精密科学仪器有限公司生产; IL-1 β 放射免疫试剂盒系北京东亚免疫技术研究院产品。

1.2 兔 BEC 的分离和培养

取新西兰兔行兔耳静脉麻醉, 股动脉放血处死, 无菌条件下结扎支气管端。喉端注入含 0.25% 胰蛋白酶的 RPMI 1640 至充盈封口结扎, 于 37 $^{\circ}$ C 作用 1 h, 剪开支气管, 以 2.5% FBS 终止反应。用支气管刷刷洗 BEC, 悬浮于 D-Hanks 中, 离心 3 次, 细胞计数稀释成 10^6 个/mL。用台盼蓝排斥法计数成活率为 (88 ± 2.2)%, Wright 染色纤毛上皮细胞占 (84 ± 2.4)%。用含 5% FBS 以及青/链霉素的 1640 配成悬液, 1×10^6 个/孔接种入鼠尾胶原包被的 24 孔板, 于 37 $^{\circ}$ C 5% CO $_2$ 饱和湿度培养箱中培养, 24 h 后换无血清培养基, 接种 24 h 后显微镜下气道上皮细胞呈单层生长, 黏壁率约为 40% ~ 60%。

1.3 BECs 分泌 IL-1 的测定

按照试剂盒的操作步骤, 样品为 BECs (1×10^6 cells/mL) 培养上清 100 μ L, 将¹²⁵I-IL-1 β 依次加入标准品与样品中, 混匀, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育 16 h 以上。然后依次加入 IL-1 β 抗血清, 室温放置 20 min, 再于 4 $^{\circ}$ C 3 500 r/min 离心 25 min, 弃上清。测沉淀中放射性 (cpm), 根据标准曲线计算 IL-1 的释放量。

1.4 BECs 分泌 IL-5 的测定

IL-5 刺激嗜酸性粒细胞增殖并使过氧化氢酶释放增加, 测定骨髓细胞与 IL-5 孵育的上清液中过氧化氢酶含量可反映 IL-5 的活性。常规提取小鼠骨髓细胞, 以 10% FBS-DEME 配成 5×10^6 cells/mL, 在 100 μ L 细胞悬液中加入 100 μ L 含 IL-5 待测上清的 BECs 培养液, 以 1:4, 1:8, 1:16 和 1:32 稀释。设置复孔, 于 37 $^{\circ}$ C 5% CO $_2$ 的饱和湿度培养箱中孵育 48 h, 3 000 r/min 离心 10 min 收获上清, 取上清 100 μ L 与过氧化物酶反应液 (含邻苯二胺 0.4 mg/mL 的 PBS 和 0.0006% H $_2$ O $_2$) 作用 30 min, 测 OD $_{492}$ 。以

稀释度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 作酶活力曲线。CAT 活性 (mU) 以诱导 50% 最大生物活性所对应的待测样品稀释度的倒数表示。

1.5 ICAM-1 蛋白表达的检测

一抗为小鼠抗兔 ICAM-1 单克隆抗体, 二抗采用即用型 sABS 免疫组织化学试剂盒, 按照使用说明操作, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作为空白对照。染色阳性结果为胞质出现棕黄色颗粒, 染色结果用 IDA2000 图像分析系统处理, 每张切片随机选取 5 个视野, 每个视野内观察 50 个细胞, 计算阳性细胞数, 并对免疫组织化学标记的每张切片随机选取 10 个阳性细胞, 测其阳性胞浆平均光密度 (OD)。

1.6 兔外周血 EOS 的分离

采集兔外周静脉血, 用 0.5% 肝素抗凝, 与 4% 多聚葡萄糖 (glucan400) 生理盐水按 2:1 的体积比于室温放置 1 h, 取富含白细胞的上层液 3 000 r/min 离心 15 min 并溶解 RBC。将回收的白细胞置于淋巴细胞分离液 (体积比 = 1:1) 中, 2 000 r/min 离心 10 min, 将下层细胞加至不连续密度梯度 Percoll 上, 1 500 r/min 离心 15 min, 收集介于 1.095 ~ 1.100 g/mL 之间的细胞层, 细胞计数为 1×10^6 个/mL。用台盼蓝排斥法计数成活率为 (86 ± 4.4)%, Wright 染色纯度为 (84 ± 3.6)%。

1.7 EOS 与 BEC 黏附率测定^[21]

BEC 在标准的 24 孔板长至融合, 测定前移去培养基, 每孔用 RPMI1640 洗涤 1 次, 各调节肽预处理组于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后, 未应激组置于室温 2 h, 臭氧应激组在室温中以臭氧攻击 2 h^[34]。处理结束后移去培养基, 将纯化的 EOS 于 37 $^{\circ}$ C 10 min 预热, 以 0.1×10^6 个/孔加入 24 孔板, 终体积 0.25 mL, 37 $^{\circ}$ C 15 min 后, 轻轻摇动培养板, 弃上清并用 RPMI 1640 洗涤 1 次, 去除未黏附 EOS, 保留的黏附细胞加入 0.25 mL 0.5% cetrimid 提取细胞中的过氧化物酶 (预实验观察发现 BEC 不含过氧化物酶), 取 50 μ L 上清加入 150 μ L 底物, 室温作用 30 min, 以 50 μ L 2 mol/L H $_2$ SO $_4$ 终止反应, 测 OD $_{492}$, 按浓度为 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 稀释的 EOS 作标准曲线, 求黏附率。

1.8 实验分组及统计学处理

实验分组 (1) 未受应激组 (2) 臭氧 (O $_3$) 应激组 (3) VIP + O $_3$ 处理组 (4) EGF + O $_3$ 处理组。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析, 两组间比较用 Dunnett *t* 检验。BEC ILs 分泌、ICAM-1 表达与 EOS 黏附功能的相关性采用直线相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺内调节肽对兔 BEC ILs 分泌的影响

O_3 攻击 2 h 可使 BEC IL-1 和 IL-5 分泌显著增加,黏附

表 1 调节肽对 BEC IL-1(ng/10⁶ cells)分泌的影响

组别	调节肽浓度(mol/L)				
	10 ⁰	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
未受应激组	0.532 ± 0.043	-	-	-	-
O_3 应激组	1.227 ± 0.091 ^{##}	-	-	-	-
O_3 + VIP	-	0.553 ± 0.079 *	0.828 ± 0.030 *	0.769 ± 0.055 *	0.887 ± 0.041 *
O_3 + EGF	-	0.643 ± 0.144 *	0.779 ± 0.027 *	0.939 ± 0.039 *	1.197 ± 0.105

与未受应激组比较,## $P < 0.01$;与 O_3 应激组比较,* $P < 0.05$

2.2 肺内调节肽对兔 BEC 表达 ICAM-1 的影响

免疫组织化学结果显示, O_3 应激可使 BEC ICAM-1 蛋白表达明显增加,VIP 与 EGF 预处理后使 O_3 应激的 BEC ICAM-1 表达显著下降(图 1 2)。

2.3 肺内调节肽对 EOS 与兔 BEC 黏附功能的影响

O_3 应激可促进 EOS 与兔 BEC 黏附,而一定浓度的 VIP 与 EGF 预处理可抑制这一过程(表

率从 6.8% 增加到 8.8% ($P < 0.05$);一定浓度的 VIP 与 EGF 预处理后降低 O_3 应激的 BEC IL-1 和 IL-5 水平($P < 0.05$) (表 1,表 2)。

3)。

2.4 BEC ILs 分泌、ICAM-1 表达与 EOS 黏附功能的相关性分析

相关分析显示,IL-1 和 IL-5 的分泌与 EOS 的黏附显著相关($r = 0.97$, $P = 0.023$) (图 3,4),而 ICAM-1 的表达亦与 EOS 的黏附显著相关($r = 0.98$, $P = 0.019$) (图 5)。

表 2 调节肽对 BEC IL-5(mU/10⁶ cells)分泌的影响

组别	调节肽浓度(mol/L)				
	10 ⁰	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
未受应激组	34.7 ± 12.1	-	-	-	-
O_3 应激组	61.6 ± 22.1 [#]	-	-	-	-
O_3 + VIP	-	28.5 ± 10.5 *	35.6 ± 12.1 *	55.5 ± 8.7	62.5 ± 11.4
O_3 + EGF	-	30.4 ± 11.2 *	41.4 ± 4.9 *	58.7 ± 12.1	64.6 ± 13.1

与未受应激组比较,# $P < 0.05$;与 O_3 应激组比较,* $P < 0.05$

表 3 调节肽对 EOS 黏附率(%)的影响

组别	调节肽浓度(mol/L)				
	10 ⁰	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
未受应激组	8.7 ± 1.7	-	-	-	-
O_3 应激组	12.7 ± 2.4 [#]	-	-	-	-
O_3 + VIP	-	6.9 ± 4.5 *	8.4 ± 4.1 *	10.7 ± 6.0 *	12.9 ± 1.7
O_3 + EGF	-	6.8 ± 2.6 *	9.2 ± 3.1 *	10.4 ± 2.7 *	12.3 ± 3.1

与未受应激组比较,# $P < 0.05$;与 O_3 应激组比较,* $P < 0.05$

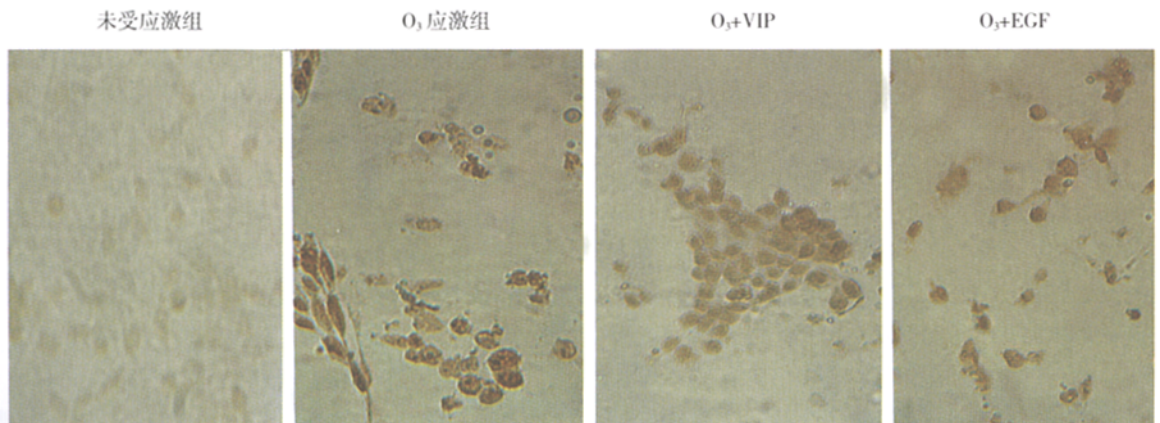


图 1 实验各组 BEC ICAM-1 的表达

Fig. 1 Expression of BEC ICAM-1 in different experimental groups

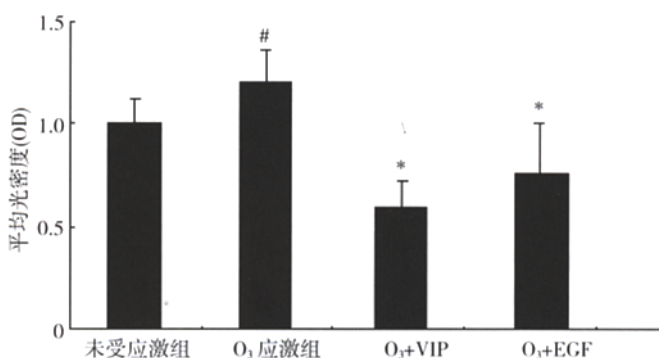


图2 实验各组 BEC ICAM-1 的平均光密度(OD)的比较 与未受应激组比较 # $P < 0.05$;与 O₃ 应激组比较 ,* $P < 0.05$

Fig.2 Comparison of the optical density of BEC ICAM-1 in different experimental groups

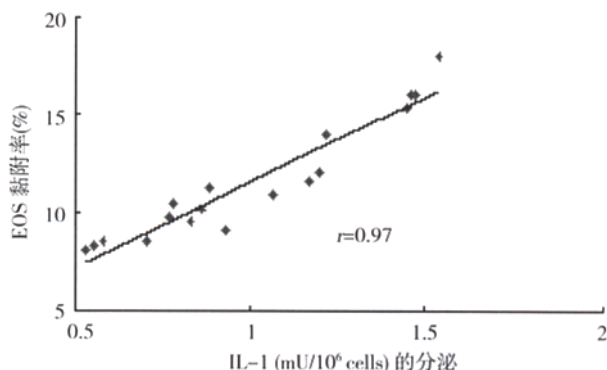


图3 IL-1 的分泌和 EOS 的黏附功能的相关性

Fig.3 Correlation between the IL-1 release and adhesion rate of EOS

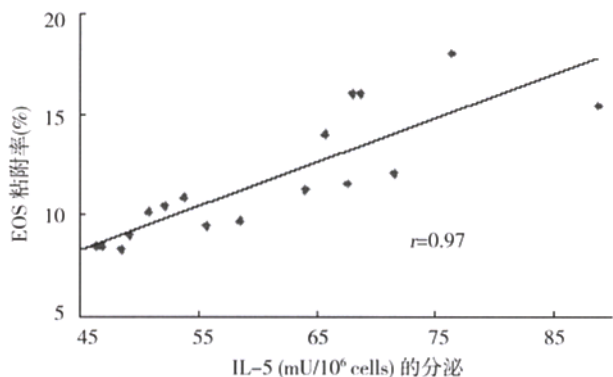


图4 IL-5 的分泌和 EOS 的黏附功能的相关性

Fig.4 Correlation between the IL-5 release and adhesion rate of EOS

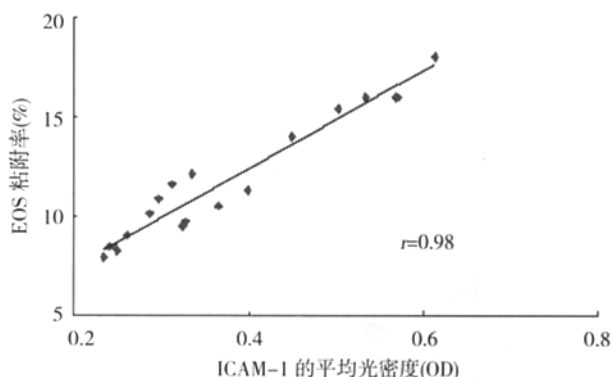


图5 ICAM-1 的表达和 EOS 的黏附功能的相关性

Fig.5 Correlation between the expression of ICAM-1 and adhesion rate of EOS

3 讨 论

气道高反应表现为呼吸道对环境一般性理化刺激、低剂量抗原、药物、内源性免疫或炎症介质等过渡反应,对病原微生物及毒性气体的抵抗力降低^[5],易发生气道阻力增高和反复感染,是哮喘、肺气肿、支气管炎等慢性阻塞性肺部疾病的共同的临床表现和病理特征^[6]。其具体发病机制还不清楚,可能与呼吸道慢性炎症过程中出现的 IgE 增多、肺部嗜酸性粒细胞聚集、呼吸道黏液的增加和呼吸道结构重塑有关。EOS 是气道各类过敏性疾病发生的重要参与者。EOS 激活后,可上调黏附分子的表达,并与 BEC 表达的 ICAM-1 结合,脱颗粒,产生活性氧代谢产物、脂类介质、蛋白酶类物质、细胞因子等,通过多种途径介导组织损伤,ICAM-1 是介导 BEC 与免疫细胞浸润黏附的主要黏附分子。VIP 和 EGF 是广泛分布于人和动物呼

吸系统内的调节肽^[7]。许多研究发现 VIP 具有显著的抗炎、抗损伤作用;VIP 可抑制 EOS 释放和黏附功能^[8-10],VIP 参与某些抗活性氧的酶蛋白的合成,具抗损伤保护作用。EGF 可能是上皮增殖及损伤修复的重要细胞因子,对有丝分裂、细胞周期及细胞的黏附能力有明显的促进作用^[11];此外,EGF 对 BEC 具有抗臭氧损伤保护作用^[12]。本实验发现,VIP 和 EGF 可以降低臭氧应激的 BEC 与 EOS 的黏附,提示这两类调节肽可抑制气道上皮的炎症或损伤反应,减轻气道高反应的发生,具有一定意义的保护作用。EOS 与 BEC 的黏附与 IL-1,IL-5 的分泌及 ICAM-1 的表达有关,肺内调节肽通过调节 ILs 的分泌和 ICAM-1 的表达,影响 EOS 与 BEC 的黏附,从而影响炎症损伤信号传递过程。

(下转第 781 页)

- [J]. *Exp Hematol* ,2005 ,33(12) :1537-1543.
- [2] Guerriero R , Testa U , Gabbianelli M , et al. Unilineage megakaryocytic proliferation and differentiation of purified hematopoietic progenitors in serum-free liquid culture[J]. *Blood* , 1995 , 86(10) : 3725-3736.
- [3] Schipper L F , Brand A , Reniers N , et al. Differential maturation of megakaryocyte progenitor cells from cord blood and mobilized peripheral blood[J]. *Exp Hematol* , 2003 , 31(4) :324-330.
- [4] Patel S R , Hartwig J H , Italiano J E Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets[J]. *J Clin Invest* , 2005 ,115(12) : 3348-3354.
- [5] Cardier J E , Foster D C , Lok S , et al. Megakaryocytopoiesis in vitro : from the stem cells ' perspective[J]. *Stem Cells* , 1996 , 14(Suppl 1) :163-172.
- [6] Mattia G , Vulcano F , Milazzo L , et al. Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34⁺ cell are correlated with different levels of platelet release[J]. *Blood* , 2002 , 99(3) :888-897.
- [7] Clarke M C , Savill J , Jones D B , et al. Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death[J]. *J Cell Biol* , 2003 , 160(4) : 577-587.
- [8] Yang H , Miller W M , Papoutsakis E T , Higher pH promotes megakaryocytic maturation and apoptosis [J]. *Stem Cell* , 2002 , 20(4) : 320-328.
- [9] Schattner M , Pozner R G , Engelberger I , et al. Effects of nitric oxide on megakaryocyte growth induced by thrombopoietin [J]. *J Lab Clin Med* , 2001 , 137(4) : 261-269.

(本文编辑 彭敏宁)

(上接第 775 页)

参考文献 :

- [1] Villa I , Melzi R , Pagani F , et al. Effects of calcitonin gene-related peptide and amylin on human osteoblast-like cells proliferation[J]. *Eur J Pharmacol* , 2000 , 409(3) :273-278.
- [2] Jagels M A , Daffern P J , Zuraw B L , et al. Mechanisms and regulation of polymorphonuclear leukocyte and eosinophil adherence to human airway epithelial cells[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol* , 1999 , 21(3) :418-427.
- [3] 秦晓群 , 向阳 , 管茶香 , 等. 整合素-配体结合反应上调兔支气管上皮细胞抗氧化能力[J]. *生理学报* , 2001 , 53(1) :41-44.
- [4] 秦晓群 , 向阳 , 罗自强 , 等. 纤维连接蛋白或精-甘-天冬氨酸肽促进兔支气管上皮细胞 NO 合成[J]. *生理学报* , 2000 , 52(6) :519-521.
- [5] Ahmed A A , Wahbi A , Nordlind K , et al. In vitro *Leishmania major* promastigote-induced macrophage migration is modulated by sensory and autonomic neuropeptides[J]. *Scand J Immunol* , 1998 , 48(1) :79-85.
- [6] 张松松 , 王悦 , 向阳 , 等. 哮喘患儿可溶性肿瘤坏死因子受体 I 的表达[J]. *湖南师范大学学报医学版* , 2005 , 2(2) :4-6.
- [7] Nagakawa O , Ogasavara M , Murata J , et al. Effect of prostatic neuropeptides on migration of prostate cancer cell lines[J]. *Int J Urol* , 2001 , 8(2) :65-70.
- [8] 管茶香 , 张长青 , 秦晓群 , 等. 血管活性肠肽对支气管上皮细胞趋化迁移的影响及机制[J]. *生理学报* , 2002 , 54(2) :103-106.
- [9] 吴昌归 , 毛宝龄 , 孙滨. 血管活性肠肽对嗜酸性粒细胞释放和黏附功能的影响及机理[J]. *中国应用生理学杂志* , 2000 , 16(3) :239-242.
- [10] 管茶香 , 周伏文 , 罗自强 , 等. 血管活性肠肽对肺组织 CTP :磷酸胆碱二胞苷酰转移酶活性的影响[J]. *湖南医科大学学报* , 2002 , 27(2) :99-101.
- [11] Fan W H , Lu Y L , Deng F , et al. EGFR antisense RNA blocks expression of the epidermal growth factor receptor and partially reverse the malignant phenotype of human breast cancer MDA-MB-231 cells[J]. *Cell Res* , 1998 , 8(1) :63-71.
- [12] 秦晓群 , 孙秀泓 , 罗自强 , 等. 表皮生长因子对培养的气道上皮细胞抗臭氧损伤的保护作用[J]. *生理学报* , 1996 , 48(2) :190-194.

(本文编辑 陈丽文)