

· 论 著 ·

IL-13 对小鼠气道平滑肌细胞的促增殖作用

曹卫军, 李 强*, 刘忠令(第二军医大学长海医院呼吸内科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 探讨 IL-13 对小鼠气道平滑肌细胞(A SMC)的促增殖作用及其机制。方法: 将分离的小鼠A SMC 进行传代培养, 在培养液中分别加入 PBS、IL-13、IL-13+ AG1478、IL-13+ TGF- α 中和抗体、IL-13+ EGF 中和抗体、IL-13+ HB-EGF 中和抗体、IL-13+ 地塞米松; 用MTT 比色法和 ^3H -TdR 掺入法测定A SMC 增殖, 用ELISA 法测定上清液中TGF- α 的浓度。结果: IL-13 组的MTT *D* 值和 ^3H -TdR 掺入量较对照组明显增加($P < 0.01$), IL-13+ AG1478 组、IL-13+ TGF- α 中和抗体组、IL-13+ 地塞米松组MTT *D* 值和 ^3H -TdR 掺入量均显著低于 IL-13 组($P < 0.01$), IL-13 组 1 h 和 3 h A SMC 分泌 TGF- α 均显著高于对照组($P < 0.01$), IL-13+ 地塞米松组显著低于 IL-13 组($P < 0.01$)。结论: IL-13 能促进 A SMC 的增殖, 其可能机制为 IL-13 刺激 A SMC 分泌 TGF- α TGF- α 与 EGFR 结合使之活化, 引起细胞增殖。

[关键词] 气道平滑肌细胞; 细胞增殖; 白细胞介素 13; 表皮生长因子受体

[中图分类号] R 562.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)07-0715-03

Promoting effects of interleukin-13 on proliferation of murine airway smooth muscle cells

CAO Wei-Jun, LI Qiang*, LIU Zhong-Ling (Department of Respiratory Diseases, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the promoting effects of interleukin-13 (IL-13) on the proliferation of airway smooth muscle cells (A SMC) in mice and its mechanism. **Methods:** Murine A SMC were isolated and subcultured. IL-13, IL-13 plus AG1478, IL-13 plus neutralizing antibody to TGF- α , IL-13 plus neutralizing antibody to EGF, IL-13 plus neutralizing antibody to HB-EGF, IL-13 plus dexamethasone were added to the media, respectively. MTT and ^3H -TdR incorporation assays were used. Apical media were analyzed for the presence of soluble TGF- α using ELISA. **Results:** The *D*₅₉₅ value of MTT assay and the cpm value of ^3H -TdR incorporation assay of IL-13 group were significantly higher than those of control group ($P < 0.01$). The *D*₅₉₅ value and the cpm value in IL-13 plus AG1478, IL-13 plus neutralizing antibody to TGF- α and IL-13 plus dexamethasone group were significantly lower than those of IL-13 group ($P < 0.01$). The concentration of released soluble TGF- α from A SMC exposed to IL-13 for 1 h and 3 h were significantly higher than that of control group ($P < 0.01$). The concentrations of released soluble TGF- α from A SMC exposed to IL-13 plus dexamethasone for 1 h and 3 h were significantly lower than that of IL-13 group ($P < 0.01$). **Conclusion:** IL-13 induces release of soluble TGF- α which binds to the epidermal growth factor receptor (EGFR) in the A SMCs and initiates proliferation. Dexamethasone inhibits the release of soluble TGF- α exposed to IL-13, and thus inhibits IL-13-induced proliferation of A SMC.

[KEY WORDS] airway smooth muscle cell; cell proliferation; interleukin-13; epidermal growth factor receptor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(7): 715-717]

[1] 支气管哮喘是多种细胞及其细胞组分参与的气道慢性炎症疾病, 气道结构重建是哮喘的特征性病理改变^[1]。病理学和形态学研究发现哮喘气道结构重建的重要特征包括平滑肌增生/肥大、气道上皮纤维化、黏液化生、弹性蛋白破坏后细胞间质的重塑和血管分布增多等^[2, 3]。支气管哮喘气道结构重建在哮喘早期即发生, 并随病程而加重, 参与了哮喘的整个慢性炎症过程。而平滑肌增生/肥大在气道结构重建、不可逆气流阻塞、气道高反应(AHR)的产生中起着重要作用。IL-13 是参与支气管哮喘发病的一种 Th2 类因子^[4], 尽管 IL-13 在哮喘发病中的作用已很受重视, 但其是否影响气道平滑肌增生/肥大、参与气道结构重建的研究至今报道极少。本研究用

体外培养小鼠气道平滑肌细胞(A SMC), 观察了 IL-13 对 A SMC 的促增殖作用及地塞米松的干预作用, 以探讨 IL-13 在哮喘气道结构重建中的作用, 寻求防治哮喘气道结构重建的新思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂 新生 3 日龄 BALB/c 小鼠由第二军医大学实验动物中心提供; 小鼠 IL-13 蛋

[基金项目] 上海市科委重点科研基金(034119828)。

[作者简介] 曹卫军(1971-), 女(汉族), 博士生, 主治医师

E-mail: weijuncao@tom.com

*Corresponding author. E-mail: liqres@sh163.net

白为英国 Pepro Tech Ec 公司产品; TGF- α 中和抗体 EGF 中和抗体 HB-EGF 中和抗体均为 Upstate 公司产品; 特异性 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 AG1478 为 Calbiochem 公司产品; DEME、胎牛血清、胰蛋白酶购于 Gibco BRL 公司; MTT 为 Sigma 公司产品; ^3H -TdR 由北京原子能研究所提供; 地塞米松磷酸钠注射液由天津市氨基酸公司人民制药厂生产, 批号 20000929; 余试剂均为国产分析纯。

1.2 小鼠 A SMC 的体外培养 颈椎脱臼法处死小鼠, 无菌摘取气管, D-Hank's 液冲洗, 解剖显微镜下仔细剥除内、外膜, 分离平滑肌条, 将其剪成 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 碎块, 用眼科镊子将小块组织移入 25 ml 培养瓶中, 等距排列, 加入含 10% 胎牛血清的培养液 3 ml, 将贴有组织块的一侧朝上, 使其不与培养液接触, 置于 37°C 5% CO_2 孵箱中培养, 3 h 后轻轻翻转培养瓶, 使植块浸入培养液中; 继续置于 37°C 5% CO_2 孵箱中静止培养, 每 3 d 换液 1 次, 约 7 d 长满后传代培养, 实验用第 4 代细胞。培养的 A SMC 经形态学和免疫组化方法鉴定。

1.3 MTT 比色法和 ^3H -TdR 掺入法测定 A SMC 增殖 取第 4 代培养的小鼠 A SMC, 0.25% 胰酶消化, 锥虫蓝染色法计数, 细胞存活率大于 95%。按 5×10^3 /孔接种于 96 孔板。培养 24 h, 换无血清培养液(使细胞生长停滞于 G_0 期)继续培养 24 h。换用含 1% 胎牛血清的培养液, 随机分为 7 组。(1)对照组: 每孔加入 PBS $20\ \mu\text{l}$; (2) L-13 组: 每孔加入 L-13 $20\ \mu\text{l}$, 终浓度为 $10^{-5}\ \text{g/L}$; (3) L-13 + AG1478 组: 每孔加入 L-13(终浓度为 $10^{-5}\ \text{g/L}$) 和 AG1478(终浓度为 $10^{-3}\ \text{g/L}$) 共 $20\ \mu\text{l}$; (4) L-13 + TGF- α 中和抗体组: 每孔加入 L-13(终浓度为 $10^{-5}\ \text{g/L}$) 和 TGF- α 中和抗体(终浓度为 $10^{-3}\ \text{g/L}$) 共 $20\ \mu\text{l}$; (5) L-13 + EGF 中和抗体组: 每孔加入 L-13(终浓度为 $10^{-5}\ \text{g/L}$) 和 EGF 中和抗体(终浓度为 $10^{-3}\ \text{g/L}$) 共 $20\ \mu\text{l}$; (6) L-13 + HB-EGF 中和抗体组: 每孔加入 L-13(终浓度为 $10^{-5}\ \text{g/L}$) 和 HB-EGF 中和抗体(终浓度为 $10^{-3}\ \text{g/L}$) 共 $20\ \mu\text{l}$; (7) L-13 + 地塞米松组: 每孔同时加入 L-13(终浓度为 $10^{-5}\ \text{g/L}$) 和地塞米松(终浓度 $10^{-6}\ \text{mol/L}$) 共 $20\ \mu\text{l}$ 。用 MTT 比色法(595 nm 处)和 ^3H -TdR 掺入法测定 A SMC 增殖。

1.4 L-13 刺激 A SMC 释放 TGF- α 及地塞米松的干预作用 取第 4 代培养的小鼠 A SMC, 0.25% 胰酶消化, 按 10^5 /孔接种于 24 孔板。培养 24 h, 换无血清培养液(使细胞生长停滞于 G_0 期)继续培养 24

h。换用含 1% 胎牛血清的培养液, 随机分为 3 组。(1)对照组: 每孔加入 PBS $20\ \mu\text{l}$; (2) L-13 组: 每孔加入 L-13 $20\ \mu\text{l}$ (终浓度为 $10^{-5}\ \text{g/L}$); (3) L-13 + 地塞米松组: 每孔同时加入 L-13(终浓度为 $10^{-5}\ \text{g/L}$) 和地塞米松(终浓度 $10^{-6}\ \text{mol/L}$) 共 $20\ \mu\text{l}$ 。1、3 h 后用 ELISA 法分别测定上清液中 TGF- α 的浓度。

1.5 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 结果进行方差分析和组间 t 检验。

2 结果

2.1 A SMC 鉴定 倒置相差显微镜下, 培养的 A SMC 长成梭形, 平行生长, 束状排列, 密集与稀疏处相互交错呈“峰谷”状。免疫组化检测法表明, 抗平滑肌 α -肌动蛋白抗体呈阳性染色。

2.2 L-13 刺激小鼠 A SMC 增殖 L-13 组的 MTT D 值为 (0.763 ± 0.018) , ^3H -TdR 掺入量为 $(7547 \pm 127)\ \text{cpm}$, 均明显高于对照组 $[(0.516 \pm 0.012)$ 和 $(6401 \pm 196)\ \text{cpm}$, $P < 0.01]$ 。

2.3 AG1478 抑制 L-13 促小鼠 A SMC 增殖 L-13 + AG1478 组 MTT D 值为 (0.523 ± 0.011) , ^3H -TdR 掺入量为 $(6341 \pm 143)\ \text{cpm}$, 均分别低于 L-13 组的 (0.761 ± 0.015) 和 $(7542 \pm 158)\ \text{cpm}$ ($P < 0.01$)。

2.4 TGF- α 参与 L-13 促小鼠 A SMC 增殖的作用

L-13 + TGF- α 中和抗体组 MTT 测定 D 值为 (0.520 ± 0.012) , ^3H -TdR 掺入量为 $(6329 \pm 211)\ \text{cpm}$, 均分别低于 L-13 组的 (0.758 ± 0.013) 和 $(7498 \pm 231)\ \text{cpm}$ ($P < 0.01$)。而 EGF 中和抗体组、HB-EGF 中和抗体组 D 值及 ^3H -TdR 掺入量与 L-13 组相比无差别。ELISA 示 1 h 后 L-13 组 A SMC 分泌 TGF- α $(359.6 \pm 8.3)\ \text{pg/ml}$, 比对照组的 $(118.8 \pm 9.6)\ \text{pg/ml}$ 增加了 2.03 倍 ($P < 0.01$); 3 h 后 L-13 组 A SMC 分泌 TGF- α $(212.4 \pm 8.7)\ \text{pg/ml}$, 比对照组增加了 1.62 倍 ($P < 0.01$)。

2.5 地塞米松对 L-13 促 A SMC 增殖的干预作用 L-13 + 地塞米松组 MTT D 值为 (0.532 ± 0.011) , ^3H -TdR 掺入量为 $(6468 \pm 154)\ \text{cpm}$, 均分别低于 L-13 组的 (0.756 ± 0.014) 和 $(7528 \pm 138)\ \text{cpm}$ ($P < 0.01$), 而与对照组的 (0.522 ± 0.012) 和 $(6441 \pm 186)\ \text{cpm}$ 相比无显著差异。ELISA 结果显示, L-13 + 地塞米松组 1、3 h 分泌 TGF- α 量分别为 (119.5 ± 7.8) 和 $(89.3 \pm 3.8)\ \text{pg/ml}$, 均显著低于 L-13 组的 (360.6 ± 8.2) 和 $(213.1 \pm 10.0)\ \text{pg/ml}$ ($P < 0.01$), 而与对照组的 (118.8 ± 8.5) 和 $(82.2 \pm$

6 0) pg/ml 相比无显著差异。

3 讨 论

IL-13 在哮喘的发病机制中起着重要作用。哮喘患者肺泡灌洗液中 IL-13 水平增高^[5]; 在哮喘小鼠模型中发现, IL-13 与气道高反应、炎症、嗜酸粒细胞增多、杯状细胞肥大、上皮纤维化有关^[6,7]。它通过激活嗜酸粒细胞, 减少其凋亡, 促进 IgE 分泌, 参与支气管哮喘炎症的维持, 诱导气道高反应性。其生物活性的发挥是通过与细胞表面相应受体 IL-4R 或 IL-13R 结合, 继而激活细胞内多种非受体型蛋白质酪氨酸激酶(PTK)而完成。但在对哮喘发生发展起重要作用的气道平滑肌增殖中是否有 IL-13 参与, 尚无定论。本实验用 MTT 法和³H-TdR 掺入法测定 ASM C 增殖情况, 结果显示 IL-13 对体外培养的小鼠 ASM C 有促增殖作用。

本实验还对 IL-13 促 ASM C 增殖作用机制进行了探讨。特异性 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 AG1478 可以抑制 IL-13 对 ASM C 促增殖作用, 提示 EGFR 的活化参与 IL-13 对 ASM C 的促增殖作用。

EGFR 是第一个被发现并克隆的受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK), 是细胞生长、分化和存活的重要调节因子。近年来对 EGFR 的研究取得了一些重要进展, 其所介导的信号转导效应具有多向性, 包括细胞增殖、迁移、分化和内环境的稳定等。EGFR 在内毒素诱导的气道损伤的修复中起重要作用^[8]。此外, EGFR 活化在气道粘蛋白合成中发挥中心调节作用, EGFR 抑制剂能够阻断粘蛋白的合成^[9,10]。EGFR 的配体有 EGF、TGF- α 、HB-EGF 等, 配体与 EGFR 结合后, 活化 EGFR, EGFR 激活众多的下游信号路径, 包括 PLC χ PI-3-K、小 G 蛋白、P21ras、rasGTP 酶激活蛋白(GAP)、生长因子受体结合蛋白 2(grb2)和 src 激酶家族等, 导致细胞增殖。哮喘患者 EGFR 及其配体均增高, 且与杯状细胞增生有关^[11,12]。本实验观察到 IL-13 诱导 ASM C 分泌 TGF- α , TGF- α 中和抗体可以抑制 IL-13 对 ASM C 的促增殖作用, 而 EGF 中和抗体组、HB-EGF 中和抗体不能抑制 IL-13 对 ASM C 促增殖作用, 提示 TGF- α 在 IL-13 对 ASM C 促增殖作用中起作用。推测 IL-13 促气道平滑肌增殖的可能机制为: IL-13 刺激气道平滑肌分泌 TGF- α , TGF- α 与 EGFR 结合, EGFR 活化, 引起细胞增殖。地塞米松通过抑制 TGF- α 的分泌, 干预 IL-13 对 ASM C

的促增殖作用。

综上所述, IL-13 促进气道平滑肌增殖, 参与气道结构重建。其中 EGFR 的活化起着重要作用, 抑制 EGFR 的活化可以阻止 IL-13 促进气道平滑肌增殖作用, 为哮喘气道结构重建的防治提供了一种新思路。

[参 考 文 献]

- [1] Fahy JV, Corry DB, Boushey HA. Airway inflammation and remodeling in asthma[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2000, 6(1): 15-20
- [2] Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, et al. Airway remodeling in asthma[J]. *Chest*, 2003, 123(3 Suppl): S417-S422
- [3] Davies DE, Wicks J, Powell RM, et al. Airway remodeling in asthma: new insights[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 111(2): 215-225
- [4] Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma[J]. *Science*, 1998, 282(5397): 2258-2261
- [5] Daheshia M, Tian N, Connolly T, et al. Molecular characterization of antigen-induced lung inflammation in a murine model of asthma[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27(5): 536-541
- [6] Kondo M, Tamaoki J, Takeyama K, et al. Interleukin-13 induces goblet cell differentiation in primary cell culture from Guinea pig tracheal epithelium[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27(5): 536-541
- [7] Vargaftig BB, Singer M. Leukotrienes, IL-13, and chemokines cooperate to induce BHR and mucus in allergic mouse lungs[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 284(2): L260-L269
- [8] Winkle LV, Isaac JM, Plopper CG. Distribution of epidermal growth factor receptor and ligands during bronchiolar epithelial repair from naphthalene-induced Clara cell injury in the mouse[J]. *Am J Pathol*, 1997, 151(2): 443-459
- [9] Shin J, Dabbagh K, Ueki IF, et al. IL-13 induces mucin production by stimulating epidermal growth factor receptors and by activating neutrophils[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 280(1): L134-L140
- [10] Takeyama K, Dabbagh K, Lee HM, et al. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(6): 3081-3086
- [11] Shatos MA, Rios JD, Horikawa Y, et al. Isolation and characterization of cultured human conjunctival goblet cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(6): 2477-2486
- [12] Takeyama K, Fahy JV, Nadel JA. Relationship of epidermal growth factor receptors to goblet cell production in human bronchi[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(2): 511-516

[收稿日期] 2004-03-05

[修回日期] 2004-05-20

[本文编辑] 曹 静