

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00917

## 烟曲霉菌提取物对人支气管上皮细胞粒-巨噬细胞集落刺激因子表达的影响

龙 飞,高福生,丁 星,祁卉卉,金先桥\*

上海交通大学附属第一人民医院呼吸内科,上海 200080

**[摘要]** 目的:探讨烟曲霉菌对呼吸道上皮细胞的粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)表达的影响及其可能机制。方法:分别应用不同浓度(0、8、16、20 mg/L)的烟曲霉菌提取物(*Aspergillus fumigatus* extract, AFE)作用体外培养人支气管上皮细胞 16HBE-14o 不同的时间(12、24、48、72 h)。同时还应用热处理的 AFE(heat-treated AFE, HT-AFE)、丝氨酸蛋白酶抑制剂(抑肽酶)、蛋白酶激活受体-2(PAR-2)激动剂(SLIGLV-NH<sub>2</sub>)和 PAR-2 阻断剂(FSLLRY-NH<sub>2</sub>)作用 16HBE-14o 细胞。应用 ELISA 法检测细胞上清液 GM-CSF 含量,同时应用 RT-PCR 法检测 GM-CSF mRNA 的表达。结果:正常培养条件下的对照组细胞仅表达分泌少量 GM-CSF,而给予不同浓度的 AFE 作用后,细胞合成和分泌 GM-CSF 的量较对照组明显增加( $P < 0.05$ ),并呈明显的时间和浓度依赖性。PAR-2 激动剂同样可以促进细胞合成分泌 GM-CSF。丝氨酸蛋白酶抑制剂和 PAR-2 阻断剂几乎完全抑制 AFE 的上述作用。HT-AFE 的蛋白酶活性完全灭活,不能促进细胞 GM-CSF 表达增加。结论:AFE 依赖其蛋白酶活性激活 PAR-2 受体,促进呼吸道上皮细胞 GM-CSF 合成和分泌,从而促进哮喘的发生和发展。

**[关键词]** 烟曲霉菌;支气管上皮细胞;粒-巨噬细胞集落刺激因子;蛋白酶激活受体-2

**[中图分类号]** R 363 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)08-0917-04

### Effects of *Aspergillus fumigatus* extract on expression of GM-CSF in human bronchial epithelial cells

LONG Fei, GAO Fu-sheng, DING Xing, QI Hui-hui, JIN Xian-qiao\*

Department of Respiratory Medicine, First Peoples' Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the effects of *Aspergillus fumigatus* extract (AFE) on the expression of GM-CSF in human bronchial epithelial cells and its possible mechanism. **Methods:** Human bronchial epithelial cells (16HBE-14o) were cultured *in vitro* and were exposed to different concentrations of AFE (0, 8, 16 and 20 mg/L) for different periods (12, 24, 48, 72 h). Moreover, heat-treated AFE, serine protease inhibitors (aprotinin), protease-activated receptor-2 (PAR-2) agonist (SLIGLV-NH<sub>2</sub>) and PAR-2 antagonist (FSLLRY-NH<sub>2</sub>) were also used to treat 16HBE-14o cells. The production and release of GM-CSF in different supernatants was determined by ELISA. The expression of GM-CSF mRNA was measured by RT-PCR. **Results:** 16HBE-14o cells in the normal control group only had slight expression of GM-CSF; the expression was significantly increased after AFE treatment ( $P < 0.01$ ); and the effect of AFE was in a time- and dose-dependent manner. PAR-2 agonist also promoted release of GM-CSF. Aprotinin and PAR-2 antagonist (FSLLRY-NH<sub>2</sub>) almost totally inhibited the effect of AFE on GM-CSF production by 16HBE-14o cells. Heat-treated AFE, which lost protease activities, exerted no effect on GM-CSF production. **Conclusion:** AFE, with its protease activity, can activate PAR-2, and subsequently causes GM-CSF synthesis and release by airway epithelial cells, which may contribute to the development and deterioration of asthma.

**[KEY WORDS]** *Aspergillus fumigatus*; bronchial epithelial cell; granulocyte-macrophage colony stimulating factor; protease-activated receptor-2

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(8):917-920]

曲霉菌是一种广泛存在于空气中的真菌,其孢子很小,容易进入呼吸道,在生长过程中会释放多种具有生物活性的酶<sup>[1]</sup>,烟曲霉菌的感染与哮喘的发病、发作的严重程度甚至患者的死亡存在明显的相关性<sup>[2]</sup>。粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)是一

种重要的炎症因子,促进气道内抗原递呈细胞的成熟和分化<sup>[3]</sup>,哮喘 TH1/TH2 失衡<sup>[4]</sup>,在哮喘的发病过程中起着非常重要的作用。呼吸道上皮细胞是 GM-CSF 的重要来源,而烟曲霉菌是否促进呼吸道上皮细胞合成和分泌 GM-CSF 目前还不清楚。本

**[收稿日期]** 2008-01-08 **[接受日期]** 2008-07-08

**[作者简介]** 龙 飞, 博士生. E-mail: earlfei@sjt. edu. cn

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-63071428, E-mail: jinxianqiao@126. com

实验通过研究烟曲霉菌提取物 (*Aspergillus fumigatus* extract, AFE) 对人支气管上皮细胞 16HBE-14o 的作用,应用 ELISA 和 RT-PCR 分别检测细胞上清液 GM-CSF 及细胞 GM-CSF mRNA 的表达,探讨 AFE 对呼吸道上皮细胞 GM-CSF 表达的影响及其可能的具体机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人支气管上皮细胞株 16HBE-14o 由广州医学院李冰教授惠赠;合成培养基 AOAC 和 Zepeck 培养基(Difco 公司);DMEM 培养基(Gibco 公司);新生牛血清(Hyclone 公司);TRIzol(Invitrogen 公司);酪蛋白(Difco 公司);人 GM-CSF 检测试剂盒(ALD 公司);SLIGLV-NH<sub>2</sub>(H-Ser-Leu-Ile-Gly-Lys-Val-NH<sub>2</sub>)(Peptides 公司),FSLRLY-NH<sub>2</sub>(H-Phe-Ser-Leu-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>)(Peptides 公司);抑肽酶(Sigma 公司);逆转录 RT 试剂盒(Fermentas 公司);通用型 PCR 试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司);BCA 法蛋白测定试剂盒为上海捷瑞公司产品;实验应用的所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成,其他化学试剂均为分析纯级。

1.2 人支气管上皮细胞株的培养 SV40 Large T 抗原永生化的支气管上皮细胞系<sup>[5]</sup> 16HBE-14o 由广州医学院李冰教授惠赠。细胞应用含 10% 新生小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素的 DMEM 培养基,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 中培养,每 2 d 换液 1 次,并以 0.25% 胰蛋白酶消化传代。实验前更换无血清的 DMEM 培养基 24 h。

1.3 烟曲霉菌提取物的制备 烟曲霉菌是从本院临床患者痰中分离培养,其提取物制备参考 Kauffman 等<sup>[1]</sup> 的方法。用合成培养基 AOAC 和 Zepeck 1:1 混合培养基静置 30℃ 培养烟曲霉菌 6 周,普通滤纸过滤培养基,4℃ 条件下透析袋(截留相对分子质量 14 000)透析 48 h 后,0.45 μm 滤膜过滤并冻干 -20℃ 保存,冻干粉为培养基提取物。应用上述培养基 30℃ 摇床(200 r/min)培养 6 d,过滤收集菌丝,冰浴匀浆,10 000×g,30 min 离心取上清,上述相同条件下透析、过滤、冻干保存,此冻干粉为菌丝提取物。后续实验应用 AFE 为培养基提取物和菌丝提取物的 1:1 混合物。冻干粉溶解于无血清 DMEM 用于实验。应用 BCA 法蛋白定量,后续实验的应用浓度为 AFE 蛋白浓度。热处理的 AFE 为 AFE 溶液置于 65℃、30 min<sup>[1]</sup>。

1.4 蛋白酶活性鉴定<sup>[6]</sup> AFE 总蛋白酶活性测定

以酪蛋白为底物。150 μl 4.8 mg/ml AFE 与 300 μl 1% (W/V) 酪蛋白(溶于 100 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) 37℃ 孵育 30 min,加入 700 μl 13% 三氯乙酸,1 000×g,10 min 离心,检测上清液在 280 nm 处的光密度(D<sub>280</sub>)。空白管:先在试管中加入 300 μl 1% 酪蛋白溶液和 700 μl 13% 三氯醋酸溶液,摇匀后,再加入 200 μl 待测样品,在 37℃ 保温 30 min,1 000×g,10 min 离心,检测上清液 D<sub>280</sub>。一个单位的蛋白酶活力定义为上述条件下 1 min 增加 0.01 D 值所需要的酶的量。

1.5 细胞培养及实验分组 人支气管上皮细胞株 16HBE-14o 常规培养于 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基,细胞生长至单层细胞,培养基无血清 DMEM 继续培养 24 h。实验分为 6 组:(1)正常溶剂对照组:只加入无血清 DMEM 培养基;(2) AFE 处理组:给予不同浓度 AFE(0、8、16、20 mg/L)作用不同时间(12、24、48、72 h);(3)热处理 AFE(HT-AFE)组:HT-AFE 替代 AFE;(4)抑肽酶(arprtinin, Apr)组:加入 AFE 之前 10 min 加入抑肽酶终浓度为 2 mg/L;(5) PAR-2 激动剂 SLIGIV-NH<sub>2</sub> 组:SLIGIV-NH<sub>2</sub>(50 mmol/L)替代 AFE;(6) PAR-2 阻断剂 FSLRLY-NH<sub>2</sub> 组:加入 AFE 之前 10 min 加入 FSLRLY-NH<sub>2</sub>,终浓度为 200 mmol/L。(3)~(6)组均作用 24 h。

1.6 ELISA 方法检测细胞上清中 GM-CSF 的含量

AFE 作用结束后收集细胞上清液,1 000×g,5 min 后 -80℃ 保存待测。应用 ELISA 法检测 GM-CSF,人 GM-CSF 测定试剂盒购自美国 ADL 公司,按说明书操作,反应完成后在酶标仪上测定 D<sub>450</sub>,画出标准曲线,得出最终浓度值。

1.7 RT-PCR 检测细胞 GM-CSF 基因表达 采用 TRIzol 试剂,参照说明书对各实验组细胞的总 RNA 进行提取。提取的 RNA 测定 D<sub>260</sub> 和 D<sub>280</sub>,二者比值在 1.8~2.0 之间的用于后续实验。取 1 μg RNA 逆转录合成 cDNA,其中 1 μl cDNA 为模板,扩增 GM-CSF。反应条件:94℃ 预变性 4 min 后,94℃ 变性 45 s,52℃ 退火 35 s,72℃ 延伸 1 min,33 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。取 5 μl 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB) 显色,目的条带用图像分析系统作灰度值测定,以 NADPH 为内参照,GM-CSF 与 NADPH 灰度值比值作为 GM-CSF mRNA 的相对含量进行半定量分析。GM-CSF 的引物序列:上游引物 5'-GCT AAA GTT CTC TGG AGG ATG-3',下游引物 5'-CTC CAA GAT GAC CAT CCT GAG-3',扩增片段长度为 536 bp。NADPH 的引物序列:上游引物 5'-TCC TGT

GGC ATC CAT GAA ACT-3,下游引物5'-GAA GCA CTT GCG GTG CAC GAT -3',扩增片段为555 bp。

1.8 统计学处理 采用SPSS 11.0软件进行统计学分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较比较采用 $q$ 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 AFE的蛋白酶活性 烟曲霉菌的菌丝提取物和培养基提取物均具有明显的蛋白酶活性,而且菌丝提取物的活性(4.72 U/mg 蛋白)明显强于培养基提取物的活性(1 U/mg 蛋白),而65℃,30 min处理后,两者蛋白酶活性完全灭活。

### 2.2 16HBE-14o细胞上清中GM-CSF的含量

16HBE-14o细胞上清ELISA检测发现,AFE刺激16HBE-14o细胞分泌GM-CSF一定范围内呈浓度和时间依赖关系。8 mg/L AFE与16 mg/L AFE在作用24 h时存在明显的统计学差异( $P < 0.05$ ),而16 mg/L AFE与24 mg/L AFE在作用24 h时无统计学差异( $P > 0.05$ )。另外16 mg/L AFE刺激细胞分泌GM-CSF与作用时间呈明显的时间依赖性,作用12 h时GM-CSF即出现明显的升高[(38.3±1.3) ng/L],24 h时为(45.0±1.9) ng/L,48 h时为(54.2±2.1) ng/L,其两两比较 $P$ 值均小

于0.05。

PAR-2受体激动剂SLIGIV-NH<sub>2</sub>可以刺激细胞分泌GM-CSF,作用24 h时浓度为(45.3±1.8) ng/L,与正常溶剂对照组比较(16.8±1.3)有显著差异( $P < 0.01$ )。热处理的AFE不能刺激16HBE-14o细胞分泌GM-CSF,作用24 h时浓度为(16.9±1.6) ng/L,与正常溶剂对照组无统计学差异( $P > 0.05$ )。细胞培养基内加入2 mg/L抑肽酶和200 mmol/L PAR-2受体阻断剂FSLRLRY-NH<sub>2</sub>几乎完全抑制AFE的作用,作用24 h时浓度分别为(16.2±1.2) ng/L、(17.3±1.7) ng/L,与正常溶剂对照组比较均无统计学差异( $P > 0.05$ )。

### 2.3 16HBE-14o细胞GM-CSF mRNA表达结果

正常16HBE-14o细胞仅有少量表达GM-CSF mRNA,其GM-CSF/GADPH灰度比值0.108±0.010,而16 mg/L AFE作用12 h时灰度比值为0.369±0.016,较正常细胞明显升高( $P < 0.05$ ),当作用时间为24 h时灰度比值为0.552±0.016( $P < 0.01$ ),48 h(灰度比值0.577±0.019)与24 h无统计学差异( $P > 0.05$ )。16 mg/L AFE作用24 h灰度比值较8 mg/L AFE(灰度比值0.320±0.026)有统计学差异( $P < 0.05$ ),而24 mg/L AFE(灰度比值0.573±0.016)与16 mg/L AFE没有明显的差异( $P > 0.05$ ),见图1。

图1 AFE对GM-CSF mRNA表达的影响

Fig 1 Effects of AFE on expression of GM-CSF mRNA

## 3 讨论

哮喘是一种多种炎症细胞、炎性介质和细胞因子参与的气道慢性炎症,哮喘气道炎症中细胞的功能、细胞间的相互作用及细胞的生长和分化受多种细胞因子的调控。其中GM-CSF主要由T细胞和巨噬细胞产生,近年来发现哮喘患者的气道上皮细胞也是GM-CSF的重要来源<sup>[7]</sup>。在哮喘发病中,GM-CSF促进气道主要抗原递呈细胞树突状细胞的成熟<sup>[3]</sup>,诱导T细胞前体生长,促进嗜酸粒细胞气道内募集,参与调节嗜酸细胞成熟、分化、活化和脱颗粒以及凋亡等过程<sup>[8]</sup>,引起气道上皮损伤、炎症细胞浸润以及气道

高反应性等<sup>[9]</sup>。GM-CSF可促进中性粒细胞增生并延长其寿命,诱导中性粒细胞脱颗粒,增加中性粒细胞PAF、LTB<sub>4</sub>的合成<sup>[10]</sup>。GM-CSF还可激活肥大细胞,促使肥大细胞表面表达高亲和力的IgE受体<sup>[11]</sup>。因此,GM-CSF几乎参与了从过敏原致敏到哮喘发病后气道炎症的整个病理生理过程。

烟曲霉菌自身抗原性和其释放出的蛋白酶能发挥多种生物活性,使其在哮喘发生发展中的地位日益受到重视<sup>[2]</sup>,我们以往的实验也证实了烟曲霉菌的感染可以明显加重大鼠哮喘的严重程度<sup>[12]</sup>,但是其具体的机制还不清楚。

本实验制备的AFE具有明显的蛋白酶活性。

其中菌丝提取物的蛋白酶活性明显高于 AFE 的蛋白酶活性。实验中应用的 AFE 为烟曲霉菌菌丝提取物和烟曲霉菌培养基提取物的 1:1 混合物,分别代表了烟曲霉菌菌丝的成分和生长过程中分泌到周围环境内的蛋白成分,AFE 体外作用可以代表吸入的烟曲霉菌对呼吸道上皮细胞的特异性作用。

本实验发现 AFE 作用于人支气管上皮细胞可以直接诱导气管上皮细胞的 GM-CSF mRNA 表达上调从而使细胞合成和分泌 GM-CSF 明显增加,而且呈明显的时间和浓度依赖关系。热处理的 AFE 蛋白酶活性完全丧失并不能有效刺激细胞合成和分泌 GM-CSF,另外实验应用的 2 mg/L 抑肽酶可以完全抑制反应体系中的丝氨酸蛋白酶活性,而 2 mg/L 抑肽酶几乎完全抑制 AFE 刺激细胞合成和分泌 GM-CSF,因此 AFE 依赖其丝氨酸蛋白酶活性刺激细胞合成分泌 GM-CSF。

蛋白激酶激活受体-2(protease-activated receptor-2, PAR-2)在哮喘患者的呼吸道上皮细胞表达明显升高,该受体激活后可以导致嗜酸粒细胞的浸润、气道的高反应性和血清中总的 IgE 水平等哮喘的多种病理生理过程<sup>[13]</sup>。本实验应用的 16HBE-14o 细胞表达 PAR-2 受体<sup>[14]</sup>。另外研究发现 PAR-2 激活可以明显促进呼吸道上皮细胞合成分泌多种细胞因子<sup>[15]</sup>。为了进一步研究 AFE 刺激上皮细胞合成和分泌 GM-CSF 的机制,实验应用 PAR-2 激动剂(SLIGIV-NH<sub>2</sub>)和阻断剂(FSLLRY-NH<sub>2</sub>)<sup>[16]</sup>,发现 PAR-2 激动剂可以刺激上皮细胞产生 GM-CSF,而阻断剂几乎完全抑制 AFE 刺激上皮细胞产生 GM-CSF。

结果表明 AFE 依靠其丝氨酸蛋白酶活性激活上皮细胞的 PAR-2,使细胞 GM-CSF mRNA 表达增加,从而使细胞合成和分泌 GM-CSF 明显增加,从而促进树突状细胞的成熟,促进嗜酸粒细胞气道内募集、成熟、分化、活化和脱颗粒等过程。本实验为 PAR-2 成为未来哮喘预防和治疗的有有效靶点奠定一定实验依据,但是 AFE 如何激活 PAR-2 及参与的下游信号分子还需要进一步研究。

(志谢 非常感谢广州医学院李冰教授无私馈赠我们人支气管上皮细胞株 16HBE-14o。非常感谢荷兰 Groningen 大学医学院变态反应学实验室 Kauffman 教授提供我们制备烟曲霉菌提取物的具体的实验方法)

## [参考文献]

[1] Kauffman H F, Tomee J F, van de Riet M A, Timmerman A J, Borger P. Protease-dependent activation of epithelial cells by

- fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 105: 1185-1193.
- [2] Denning D W, O'Driscoll B R, Hogaboam C M, Bowyer P, Niven R M. The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence [J]. *Eur Respir J*, 2006, 27: 615-626.
- [3] Bleck B, Tse D B, Jaspers I, Curotto de Lafaille M A, Reibman J. Diesel exhaust particle-exposed human bronchial epithelial cells induce dendritic cell maturation [J]. *J Immunol*, 2006, 176: 7431-7437.
- [4] Liu L Y, Mathur S K, Sedgwick J B, Jarjour N N, Busse W W, Kelly E A. Human airway and peripheral blood eosinophils enhance Th1 and Th2 cytokine secretion. [J]. *Allergy*, 2006, 61: 589-597.
- [5] Haws C, Krouse M E, Xia Y, Gruenert D C, Wine J J. CFTR channels in immortalized human airway cells [J]. *Am J Physiol*, 1992, 263: 692-707.
- [6] Setyorini E, Takenaka S, Murakami S, Aoki K. Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular proteases from *Bacillus subtilis* strain FP-133 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70: 433-440.
- [7] Zhang N, Truong-Tran Q A, Tancowny B, Harris K E, Schleimer R P. Glucocorticoids enhance or spare innate immunity: effects in airway epithelium are mediated by CCAAT/enhancer binding proteins [J]. *J Immunol*, 2007, 179: 578-589.
- [8] Ip W K, Wong C K, Wang C B, Tian Y P, Lam C W. Interleukin-3, -5, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor induce adhesion and chemotaxis of human eosinophils via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2005, 27: 371-93.
- [9] Lampinen M, Carlson M, H kansson L D, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease [J]. *Allergy*, 2004, 59: 793-805.
- [10] Carlson M, Peterson C, Venge P. The influence of IL-3, IL-5, and GM-CSF on normal human eosinophil and neutrophil C3b-induced degranulation [J]. *Allergy*, 1993, 48: 437-442.
- [11] Takahashi K, Hayashi N, Kaminogawa S, Ra C. Molecular mechanisms for transcriptional regulation of human high-affinity IgE receptor beta-chain gene induced by GM-CSF [J]. *J Immunol*, 2006, 177: 4605-4611.
- [12] 王 妍, 龙 飞, 祁卉卉, 金先桥. 烟曲霉菌孢子对哮喘大鼠气道炎症和气道反应性的影响 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2007, 6: 185-190.
- [13] Reed C E, Kita H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114: 997-1008.
- [14] Dulon S, Cand C, Bunnett N W, Hollenberg M D, Chignard M, Pidadar D. Proteinase-activated receptor-2 and human lung epithelial cells: disarming by neutrophil serine proteinases [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 28: 339-346.
- [15] Page K, Hughes V S, Odoms K K, Dunsmore K E, Hershenson M B. German cockroach proteases regulate interleukin-8 expression via nuclear factor for interleukin-6 in human bronchial epithelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 32: 225-231.
- [16] Zhang H, Yang X, Yang H, Zhang Z, Lin Q, Zheng Y, et al. Modulation of mast cell proteinase-activated receptor expression and IL-4 release by IL-12 [J]. *Immunol Cell Biol*, 2007, 85: 558-566.

[本文编辑] 曹 静