

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.02.003

IL-1 β 诱导支气管上皮细胞高迁移率族蛋白 1 主动释放*谭小玉,侯长春,陈俊健,黎雨,刘唐娟,周鸿江 Δ
(广西医科大学第一附属医院西院呼吸内科,南宁 530007)

摘要:目的 研究 IL-1 β 对健康人支气管上皮细胞(HBE)高迁移率族蛋白 1(HMGB1)表达和释放的影响。方法 培养 HBE135-E6E7,四唑盐(MTT)法检测不同浓度 IL-1 β 对支气管上皮细胞活力的影响,荧光定量 PCR 检测 IL-1 β 刺激 HBE 后 HMGB1 mRNA 表达,双抗体夹心 ELISA 法检测细胞上清液中 HMGB1 水平,蛋白免疫印迹方法检测 IL-1 β 刺激 HBE 总蛋白、胞核、胞质 HMGB1 表达。免疫荧光观察 IL-1 β 刺激后对 HBE HMGB1 的移位的影响。结果 0.1、1.0、10.0 ng/mL IL-1 β 刺激 HBE 24 h 对其活力无影响。IL-1 β 以浓度和时间依赖性方式刺激 HBE 的 HMGB1 mRNA 水平升高,IL-1 β 增加 HBE 的 HMGB1 蛋白表达水平。在浓度依赖性实验,与对照组比较,1.0、10.0 ng/mL IL-1 β 刺激 HBE 24 h 后培养上清液 HMGB1 水平显著增加;在时间依赖性实验中,与对照组比较,10.0 ng/mL IL-1 β 刺激 HBE 12 h、24 h 后细胞上清液中的 HMGB1 显著升高($P < 0.05$);10.0 ng/mL IL-1 β 刺激 HBE 24 h 后,HBE 胞质蛋白明显增加,胞核蛋白减少。免疫荧光检测显示, HMGB1 主要表达正常 HBE 的细胞核内,少量分布于细胞质,IL-1 β (10.0 ng/mL)刺激 HBE 24 h, HMGB1 明显从 HBE 胞核向胞质转位。结论 IL-1 β 可以显著诱导支气管上皮细胞 HMGB1 的表达和主动释放,提示 HMGB1 可能参与了 IL-1 β 介导慢性气道炎症过程。

关键词:白细胞介素 1 β ;高迁移率族蛋白类;支气管上皮细胞;气道炎症

中图分类号:R562.2

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)02-0151-04

Inducing effect of IL-1 β about the release of HMGB1 in human bronchial epithelial cells*Tan Xiaoyu, Hou Changchun, Chen Junjian, Li Yu, Liu Tangjuan, Zhou Hongjiang Δ

(Department of Respiratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530007, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of IL-1 β on the expression and release of high mobility group box 1 (HMGB1) from normal human bronchiolar epithelial cell (HBE). **Methods** HBE135-E6E7 was developed and methyltetrazolium (MTT) assay was used to assess the viability of HBE cell line under different concentration of IL-1 β . The mRNA expression of HMGB1 in HBE after stimulating with IL-1 β were determined by Real-time PCR; the level and location of HMGB1 in the cytoplasm, nucleus and culture medium of HBE after stimulating with IL-1 β were detected by Western blot and ELISA assay. The expression and translocation of HMGB1 of HBE after stimulating with IL-1 β were detected by Immunofluorescence. **Results** 0.1, 1.0, 10.0 ng/mL IL-1 β did not influence the cell viability of HBE; IL-1 β increased the mRNA expression of HMGB1 in HBE in dose- and time-dependent manner and increased the protein expression of HMGB1 in HBE. In comparison with control group, the levels of HMGB1 in the culture medium significantly increased after stimulation with IL-1 β at 1.0, 10.0 ng/mL for 24 h ($P < 0.05$) in the dose dependent experiments; and in time dependent experiments, 10.0 ng/mL IL-1 β significantly increased HMGB1 level in the culture medium after stimulation for both 12 h and 24 h ($P < 0.05$). After stimulation with IL-1 β (10.0 ng/mL) for 24 h, the HMGB1 expression in cytoplasm significantly increased in plasmosin and decreased in nucleus. HMGB1 translocated from nuclei to cytoplasm after stimulation with IL-1 β (10.0 ng/mL) for 24 h. **Conclusion** IL-1 β could induce HMGB1 expression and release in human bronchial epithelial cells, which indicates that HMGB1 may involve in IL-1 β -mediated chronic airway inflammation.

Key words: interleukin-1beta; high mobility group proteins; bronchial epithelial cells; airway inflammation

慢性气道炎症是支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD)等慢性气道疾病的核心病理生理学改变,IL-1 β 是已发现的启动和维持炎症最主要的因子之一^[1]。研究发现,IL-1 β 在哮喘患者的肺泡灌洗液和肺活检标本中显著增高,支气管上皮细胞是主要来源^[2],但 IL-1 参与气道炎症机制未完全明了。气道上皮细胞在气道及肺部固有免疫和获得性免疫过程中扮演着重要角色,研究表明气道上皮细胞可通过释放肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)等炎症因子参与哮喘、COPD 等慢性气道疾病炎症过程^[3]。高迁移率族蛋白 1 (high mobility group protein B1, HMGB1) 在内毒素血症作为晚期炎症介质发挥促炎作用,众多研究也表明 HMGB1 参与多

种局部性和全身性炎症性疾病的炎症过程^[4-5]。有研究证明, HMGB1 在哮喘和 COPD 患者诱导痰、肺活检标本中显著增加,与肺功能严重程度呈显著正相关,表明 HMGB1 是参与慢性气道炎症发生、发展一种重要炎症介质^[6-7]。本研究探讨 IL-1 β 能否诱导支气管上皮细胞的 HMGB1 表达和释放,以增加对 IL-1 β 参与慢性气道疾病发病机制的理解,现报道如下。

1 材料与方

1.1 材料选用 健康人支气管上皮细胞(HBE)135-E6E7(美国 ATCC, CRL-2741TM); 胞核蛋白提取试剂盒(武汉博士德公司); Human HMGB1 ELISA kit (ground biotechnology diagnostic, USA)。

1.2 方法

1.2.1 培养 HBE135-E6E7 用含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 的链霉素的 RPMI-1640 培养基, 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 80%~90% 融合后, 2~3 d 传一代。HBE 细胞胰酶消化后, 按 2.5×10⁴ 个/cm² 的密度传至 6 孔板、24 孔板、96 孔板, 继续培养, 细胞刺激前 24 h 换成角质化无血清培养基培养。分别加入不同浓度 IL-1β。

1.2.2 四唑盐(MTT)比色法检测细胞活力 传至 96 孔板的 HBE, 加入 0.1、1.0、10.0 ng/mL 不同浓度的 IL-1β, 同时以未加任何处理因素的 HBE 作为对照组, 每个浓度设 8 个复孔。培养 24 h 后, 每孔加入浓度为 5 mg/mL 的 20 μL MTT, 37 °C、5% CO₂ 培养箱内孵育 4 h, 弃培养液, 加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO)振荡仪振荡至晶体颗粒溶解, 在酶标仪上测定 490 nm 的吸光度值(A 值), 细胞活力=(加 IL-1β 组 A 值-不加细胞组 A 值)/(不加 IL-1β 对照组 A 值-不加细胞组 A 值)×100%。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(RT-PCR) 采用异硫氰酸胍法提取总 RNA。将 IL-1β 处理或对照的 HBE(6 孔板)加入 TRIzol (invitrogen) 1 mL 吹匀, 然后经过氯仿萃取, 异丙醇沉淀, 70% 乙醇冲洗沉淀后, 以焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解。用分光光度计测量 RNA 浓度, 以 1 μg 总 RNA 为底物, 加入 20 μL RT 反应体系中进行反转录合成 cDNA(按 format; thermo scientific 说明书进行), -20 °C 冻存备用。Real-time PCR 反应中所用的引物: HMGB1 引物: 上游: 5'-TGT CCA CAC ACC CTG CAT ATT G-3', 下游: 5'-AAT CCC ATG GTG TGA CAG AAT GGA-3', 序列长度为 446 bp; β-actin: 上游 5'-AAG AGA GGC ATC CTC ACC CT-3' 和下游 5'-TAC ATG GCT GGG GTG TTG AA-3', 序列长度为 324 bp。RT-PCR 反应条件: 95 °C 变性 5 min, 95 °C 15 s, 60 °C 45 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。采用 SYBR Premix EX Taq(Takana) 荧光, 整个 RT-PCR 过程在 ABI 7900 荧光定量 PCR 仪上完成, 荧光信号使用 SDS 软件分析。每组实验重复 3 次。

1.2.4 免疫蛋白印迹检测 IL-1β 刺激 HBE 总蛋白、胞核、胞浆 HMGB1 表达 按胞质和胞核蛋白提取试剂盒(武汉博士德公司)说明书步骤提取胞质胞核蛋白, 简述如下: 收集处理后的细胞, 加入 100 μL 预冷的缓冲液 A [10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES), pH 7.9; 10 mmol/L KCl; 0.1 mmol/L EDTA; 0.1 mmol/L 乙二酸醇双(2-氨基乙基醚)四乙醇(EGTA); 1 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT); 0.5 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)] 剧烈震荡 30 s 后, 冰上静置 15 min 破坏细胞膜, 2 000×g 离心 10 min, 上清液部分即为胞质蛋白, 沉淀, 加入 15 μL 预冷的缓冲液 B (20 mmol/L HEPES, pH 7.9; 0.4 mol/L NaCl; 1 mmol/L EDTA; 1 mmol/L EGTA; 1 mmol/L DTT; 1 mmol/L PMSF) 冰上静置 30 min, 每隔 5 min 剧烈振荡 1 次, 破坏核膜, 4 °C 下 15 000×g 离心 5 min, 上清液含核蛋白组分。BCA 法蛋白质定量置 -80 °C 冰箱保存备用。经 10% 十二烷基-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳分离 1.5 h、转膜 1.5 h 到硝酸纤维素膜(Pall 公司)和 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, 依次加入兔抗 HMGB1, β-actin 单克隆抗体(Abcam 1:1 000) 1% TBST 4 °C 过夜、辣根过氧化物酶耦联的兔抗羊(中衫金桥, 1:6 000), ECL 化学发光法显影, Quantity One 凝胶成像系统观察分析条带灰度值。

1.2.5 双抗体夹心 ELISA 法检测培养基中 HMGB1 严格按照 Human HMGB1 ELISA Kit 的说明书操作。将 50 μL 标

准品和上清液加入抗体包被的 96 孔板内, 在上清液样本孔中分别加入 50 μL 酶标记溶液后充分混匀; 置于温箱内 37 °C 孵育 60 min; 用 1×PBS 手工洗板清洗 5 次; 每孔各加 50 μL 反应液 A 和 B; 盖起微孔板 37 °C 孵育 15 min, 每孔加 50 μL 终止液终止反应, 30 min 后用酶标仪测定每孔的吸光度值(450 nm), 依据标准曲线计算上清液样本蛋白浓度。实验重复 3 次。

1.2.6 免疫荧光观察 IL-1β 刺激后对 HBE HMGB1 的移位的影响 在支气管上皮细胞爬片后, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.1% Triton-100 处理 10 min, 每片滴 50 μL 5% BSA 封闭, 37 °C, 30 min; 滴加 HMGB1 一抗(1:100 稀释) 37 °C, 90 min, PBS 冲洗 3 次; 避光滴加荧光二抗, 37 °C, 60 min, PBS 冲洗; 50% 甘油封片, 荧光显微镜下观察、照相。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 多组间比较采用 SNK 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 比色法检测不同浓度 IL-1β 对细胞活力的影响 分别用 0、0.1、1.0、10.0 ng/mL 浓度 IL-1β 刺激 HBE 24 h, 各组细胞活力分别为 100.0%、95.6%、100.3%、105.2% (图 1)。与对照组比较, 各浓度的 IL-1β 对 HBE 活力影响差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

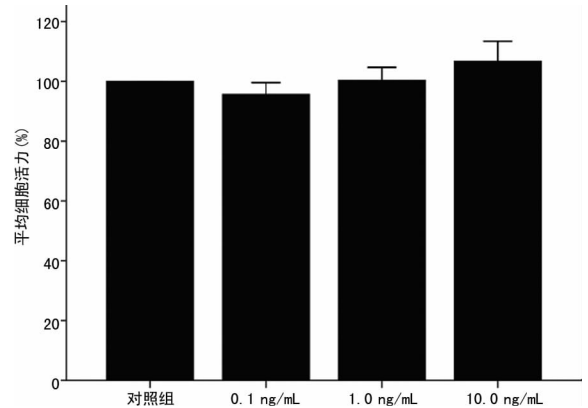
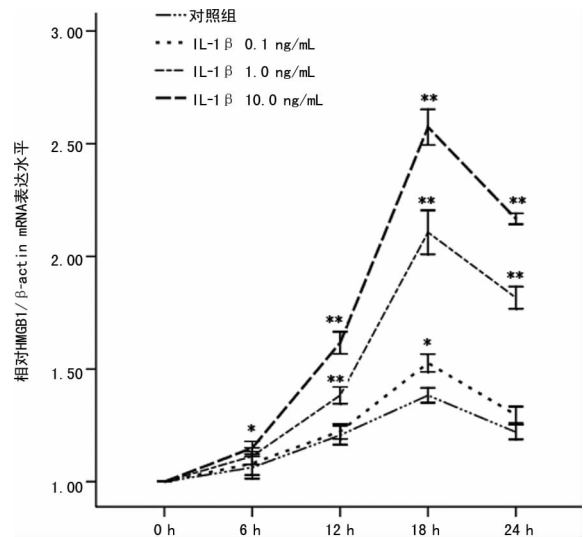


图 1 不同浓度 IL-1β 对 HBE 细胞活力影响 ($n=8$)



*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 2 IL-1β 上调了 HBE 的 HMGB1 的 mRNA 表达水平

2.2 IL-1β 对支气管上皮细胞 HMGB1 mRNA 和蛋白表达影响 支气管上皮细胞组成性表达 HMGB1, 对照组 HBE 的

HMGB1 mRNA 表达水平在 18 h 最高(图 2)。IL-1 β 以浓度和时间依赖方式增加了 HBE 的 HMGB1 mRNA 表达水平,最显著的差异性发生在 IL-1 β 10 ng/mL 刺激 HBE 18 h 时,约为对照组 2.5 倍(2.78 \pm 0.08 vs. 1.35 \pm 0.04)。IL-1 β 0.1 ng/mL 只是在 18 h 轻度增加了 HMGB1 mRNA 表达。IL-1 β 1.0、10.0 ng/mL 刺激 HBE 24 h, HBE 的 HMGB1 蛋白表达水平升高,IL-1 β 10 ng/mL 更明显,见图 3。

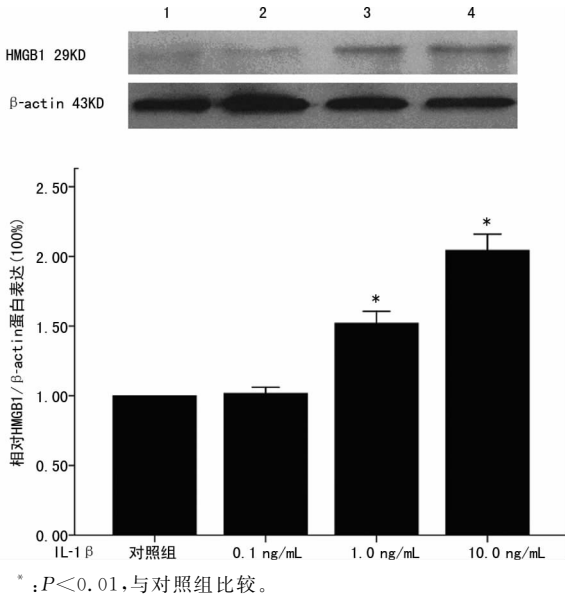


图 3 IL-1 β 上调了 HBE 的 HMGB1 的蛋白表达水平

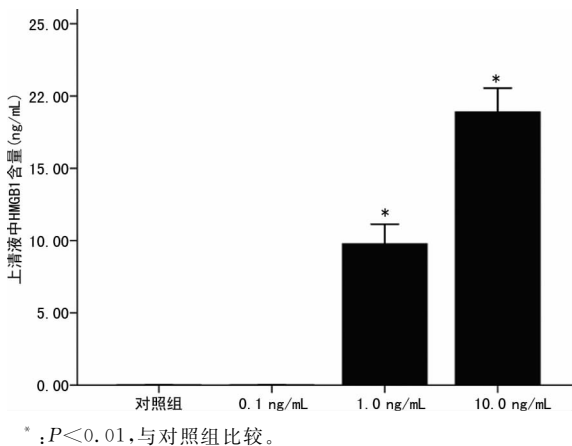


图 4 ELISA 检测不同剂量 IL-1 β 对 HBE 释放 HMGB1 的影响

2.3 IL-1 β 对支气管上皮细胞 HMGB1 释放的影响 0、0.1、1.0、10.0 ng/mL IL-1 β 刺激 HBE 24 h 后上清液 HMGB1 蛋白含量分别为(9.77 \pm 1.03)ng/mL 及(18.90 \pm 1.34)ng/mL, 统计分析发现对照组和 0.1 ng/mL IL-1 β 刺激组细胞上清液 HMGB1 含量低于试剂盒检测下限。1.0 ng/mL 和 10.0 ng/mL IL-1 β 刺激 HBE 24 h 后 HMGB1 蛋白含量明显增加,10.0 ng/mL IL-1 β 更加显著($P < 0.05$), IL-1 β 对 HBE HMGB1 的释放有剂量依赖性(图 4)。本研究也观察了 IL-1 β 影响 HMGB1 分泌释放有时间依赖性,10.0 ng/mL IL-1 β 刺激 HBE 0、6、12 h 及 24 h 后上清液中 HMGB1 蛋白含量分别为(11.60 \pm 0.83)ng/mL、(19.80 \pm 0.89)ng/mL, 统计学分析后发现:10.0 ng/mL IL-1 β 刺激支气管上皮细胞 6 h 后,细胞上清液中 HMGB1 含量无变化,而当刺激时间延长至 12 h 和 24 h,上清液中 HMGB1 含量明显增加($P < 0.05$),见图 5。

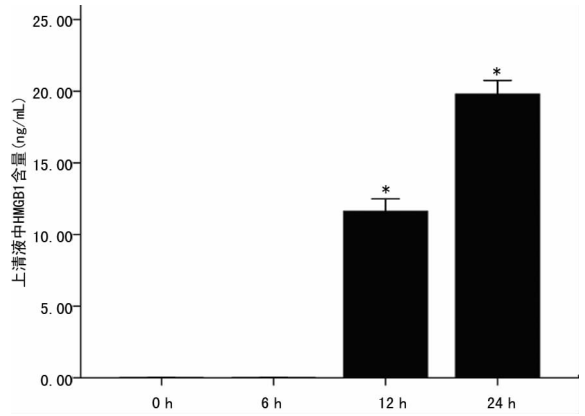
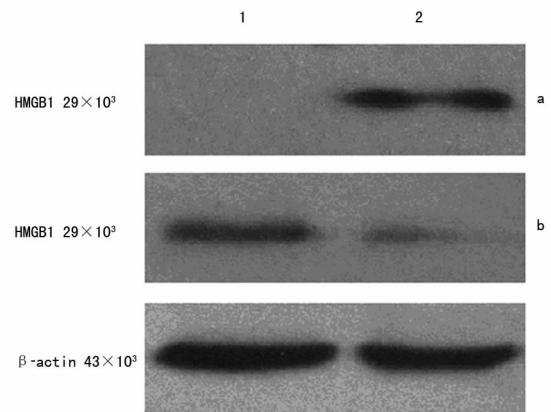


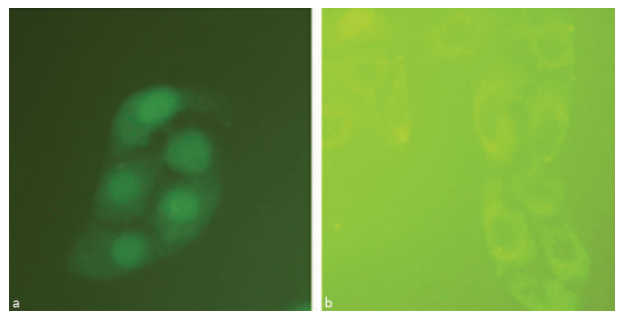
图 5 在不同时间点 IL-1 β (10.0 ng/mL)对 HBE 细胞培养上清液 HMGB1 水平的影响

2.4 IL-1 β 对 HBE 胞质和胞核 HMGB1 含量影响 通过蛋白免疫印迹方法检测发现 IL-1 β (10.0 ng/mL)刺激 HBE 24 h 后,发现胞核蛋白有减少,而细胞质蛋白相应明显增加,这进一步印证了 IL-1 β 诱导了 HBE 的 HMGB1 的释放(图 6)。免疫荧光发现 HMGB1 高丰度表达于未受刺激 HBE 的细胞核,少量表达于细胞质,免疫荧光进一步证实 IL-1 β 刺激 HBE, HMGB1 从胞核中转位出来,见图 7。



1: 对照组; 2: IL-1 β (10.0 ng/mL)组; a: 细胞质; b: 细胞核。

图 6 IL-1 β (10.0 ng/mL)对 HBE 细胞质和细胞核 HMGB1 表达的影响



A: 在正常的 HBE 上 HMGB1 的定位和表达; B: IL-1 β (10.0 ng/mL)刺激 HBE 24 h 后 HMGB1 向胞质移位。

图 7 免疫荧光观察 IL-1 β 对 HBE HMGB1 表达及移位的影响

3 讨论

HMGB1 在非应激状态下主要定位细胞核内,在细胞因子、损伤等应激状态下, HMGB1 可以被主动释放到胞外,发挥其胞外促炎症等效应^[5]。研究发现 H₂O₂ 可以诱导支气管上

皮细胞 HMGB1 的主动释放^[8]。本研究在体外研究发现, IL-1 β 可以浓度和时间依赖性地增加支气管上皮细胞 HMGB1 表达, 并促进 HMGB1 从胞核向胞浆转位和主动释放到胞外。

研究证明 IL-1 β 是启动和维持机体内炎症反应最重要的细胞因子之一^[1], 是一种典型的多功能细胞因子。IL-1 β 可以促进单核细胞、中性粒细胞等多种免疫细胞和组织细胞炎症因子释放, 亦可以促进骨髓修复, 有利于癌症治疗。IL-1 β 在稳定期 COPD 患者中产生增多, 在 COPD 急性加重期进一步升高^[9], IL-1 β 在哮喘患者支气管上皮细胞、巨噬细胞和肺泡灌洗液中表达也增加^[2]。Lappalainen 等^[10]通过 IL-1 β 转基因动物模型证明高表达 IL-1 β 可以引起肺泡间隔扩大、气管壁增厚、黏液分泌增加、肺间质纤维化等, 这些符合支气管哮喘和 COPD 病理学改变。初步揭示 IL-1 β 诱导肺部这些病变与增加中性粒细胞趋化因子 CXCL1、CXCL2 和基质金属蛋白酶 (MMP-9 和 MMP-12) 有关, 但是否存在其他机制尚不明确。

HMGB1 是细胞核内非组蛋白染色质蛋白, 核内主要参与稳定染色质结构与功能并协调基因转录调控。HMGB1 作为损伤相关分子模式 (DAMPs) 分子通过释放到胞外发挥促炎症作用成为近年来该分子研究的热点^[11]。单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等炎症细胞在各种外界刺激因素或应激下 HMGB1 可以从细胞中释放出来, 促进炎症反应。在脓毒血症和关节炎等炎症过程中, HMGB1 可以通过募集中性粒细胞, 促进内皮细胞表达黏附分子, 促进树突状细胞成熟等途径参与促炎反应^[11]。

HMGB1 在真核生物细胞核中广泛高丰度表达, 在肺部 HMGB1 被发现主要高表达于支气管上皮细胞和肺泡巨噬细胞^[12], OVA 致敏哮喘小鼠模型进一步被证实 HMGB1 主要定位于支气管上皮细胞^[13]。这些结果高度提示支气管上皮细胞是肺部 HMGB1 主要来源, 这也是本研究选择支气管上皮细胞作为研究靶点的主要原因。本研究首先通过 MTT 法证实实验选用浓度的 IL-1 β 对支气管上皮细胞无毒性, 而且 IL-1 β 的剂量也接近于体内生理量和哮喘、COPD 患者肺内表达量。本研究发现 IL-1 β 不仅能诱导 HMGB1 表达, 还可促进 HMGB1 的转位和主动释放, 进一步验证了气道上皮细胞是作为 DAMPs 分子 HMGB1 的重要来源。本研究发现的 IL-1 β 促进 HMGB1 的主动释放类似于既往的研究, 均具有一定时间和浓度依赖性^[8]。更重要的是, 大量的研究证实 HMGB1 在哮喘和 COPD、慢性肺源性心脏病发病中起作用, 因而被诱导释放 HMGB1 可能是 IL-1 β 介导慢性气道炎症的新机制之一^[6-8, 13-15]。IL-1 β 不仅可以通过增加 CXCL1、CXCL2 和基质金属蛋白酶来加剧气道炎症, 通过诱导释放 HMGB1 也可能是另一条重要途径。

目前气道上皮细胞 HMGB1 释放的机制涉及相关的信号通路的活化尚不清楚, 而释放到局部气道腔能否与 IL-1 β 形成复合物也是值得探讨的问题, 因为 HMGB1-IL-1 β 复合物促炎症功能远大于单一的 HMGB1 或 IL-1 β 。这些是本研究课题组接下来探讨的方向, 将进一步研究。

参考文献:

[1] Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease

[J]. *Blood*, 1996, 87(6):2095-2147.

[2] Sousa AR, Lane SJ, Nakhosteen JA, et al. Expression of interleukin-1 beta (IL-1beta) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on asthmatic bronchial epithelium [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154(4 Pt 1):1061-1066.

[3] Kato A, Schleimer RP. Beyond inflammation; airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity [J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(6):711-720.

[4] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice [J]. *Science*, 1999, 285(5425):248-251.

[5] Yang H, Wang H, Czura CJ, et al. The cytokine activity of HMGB1 [J]. *J Leukoc Biol*, 2005, 78(1):1-8.

[6] Hou C, Zhao H, Liu L, et al. High mobility group protein B1 (HMGB1) in Asthma; comparison of patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy controls [J]. *Mol Med*, 2011, 17(7/8):807-815.

[7] Ferhani N, Letuve S, Kozhich A, et al. Expression of high-mobility group box 1 and of receptor for advanced glycation end products in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181(9):917-927.

[8] 侯长春, 赵海金, 李文军, 等. 过氧化氢诱导支气管上皮细胞高迁移率族蛋白 1 主动释放 [J]. *南方医科大学学报*, 2010, 32(8):1131-1134.

[9] Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Eur Respir J* 2001, 34(Suppl 1):S50-59.

[10] Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE, et al. Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 32(4):311-318.

[11] Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(4):331-342.

[12] Hamada N, Maeyama T, Kawaguchi T, et al. The role of high mobility group box1 in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 39(4):440-447.

[13] 付亮, 蔡绍曦, 赵海金, 等. N-乙酰半胱氨酸对哮喘小鼠肺组织 HMGB1、RAGE 表达的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(5):692-699.

[14] Shim EJ, Chun E, Lee HS, et al. The role of high-mobility group box-1 (HMGB1) in the pathogenesis of asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2012, 42(6):958-965.

[15] 其美卓嘎, 仓姆拉, 李献, 等. HMGB1 在高原慢性肺源性心脏病急性发病过程中的检测及意义 [J]. *重庆医学*, 2007, 36(10):909-911.

(收稿日期:2014-09-09 修回日期:2014-11-28)