

不同滴度噬菌体 D29 对气道上皮细胞 9HTE 的生长及功能影响研究*

梁梅, 郭述良^{2△}, 张红梅³

(1. 重庆市渝北区人民医院呼吸内科 401120; 2. 重庆医科大学附属第一医院呼吸内科, 重庆 400016; 3. 重庆市第五人民医院呼吸内科 400062)

[摘要] **目的** 研究噬菌体 D29 不同滴度对气道上皮细胞株 9HTE 的生长及功能影响。**方法** 分别用高滴度(10^9 PFU/mL)和低滴度(10^7 PFU/mL)噬菌体 D29 及噬菌体缓冲液组作用于 9HTE 细胞株后,用四甲基偶氮唑蓝比色法(MTT)检测细胞生长情况;用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测量细胞上清液白细胞介素(IL)-6、IL-8 水平;用逆转录 PCR(RT-PCR)检测细胞间黏附分子-1(ICAM-1)mRNA 的表达,用流式细胞技术检测细胞凋亡率。**结果** 高、低滴度噬菌体 D29 作用气道上皮细胞一段时间后,对细胞生长活性、细胞因子 IL-6、IL-8 和 ICAM-1 mRNA 的表达,以及细胞凋亡率的影响与噬菌体缓冲液组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 高、低滴度噬菌体 D29 对体外培养的气道上皮细胞生长及功能无明显影响。

[关键词] 细菌噬菌体;气管;白细胞介素类;血管细胞黏附分子 1;气道上皮细胞;安全性**[中图分类号]** R329.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)15-2024-03

Effects of different titers of bacteriophage D29 on growth and function of airway epithelia cell 9HTE*

Liang Mei¹, Guo Shuliang^{2△}, Zhang Hongmei³

(1. Department of Respiratory, People's Hospital of Yubei District, Chongqing 401120, China; 2. Department of Respiratory, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Department of Respiratory, the Fifth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400062, China)

[Abstract] **Objective** To research the effects of different titers of bacteriophage D29 on growth and function of airway epithelial cell 9HTE. **Methods** Cell viability rates was analyzed after applying high(10^9 PFU/mL) and low(10^7 PFU/mL) titers of bacteriophage D29 and phage buffer respectively by MTT colorimetry. Additionally, the secretion levels of IL-6, IL-8 in cell culture supernatant were detected by ELISA. RT-PCR was performed to detect the expression of ICAM-1 mRNA. Cell apoptosis rate was analyzed by flow cytometry. **Results** There was no difference in cell growth, secretion levels of IL-6, IL-8, ICAM-1 mRNA and cell apoptosis rate between cells treated with high and low titers of D29 and phage buffer($P>0.05$). **Conclusion** Neither high nor low titer of bacteriophage D29 exerts effect on growth and function of airway epithelial cell 9HTE *in vitro*.

[Key words] bacteriophages; trachea; interleukins; vascular cell adhesion molecule-1; airway epithelial cells; security

当前,结核病仍是全球最严重的公共卫生问题之一,2014 年全球 960 万人患有结核病,其中 150 万人因感染结核而死亡,48 万人为耐多药结核病。结核病耐药形势严峻,而现有的治疗方案无法达到令人满意的效果,因此急需研发新的治疗结核病的方法和制剂。噬菌体作为细菌病毒中的一种,能在感染细菌周期末期特异性裂解宿主菌,故可作为抗菌制剂而被用于研究^[1],特别是用于耐药菌的治疗^[2]。噬菌体 D29 能裂解结核分枝杆菌,有望用于结核病的诊断和治疗。本课题组前期研究发现,噬菌体 D29 能裂解巨噬细胞内的结核分枝杆菌,使结核病模型豚鼠肝、脾脏器荷菌量减少,这为研制耐药结核病治疗用噬菌体制剂奠定了基础^[3]。且前期研究还发现噬菌体 D29 通过呼吸道吸入后到达肺部的滴度比皮下、肌内注射高,且维持时间长,表明气道给药可能有利于治疗肺结核^[4]。但通过呼吸道吸入噬菌体安全性如何还不得而知,本文通过对噬菌体 D29 对体外培养的气道上皮的生长和功能研究,以期了解噬菌体通过气道给药的安全性。

1 材料与方

1.1 材料 试验材料:气道上皮细胞株 9HTE,由重庆市儿童医院呼吸科实验室惠赠;噬菌体 D29 由中国药品生物制品检定所王国治教授惠赠。试剂:DMEM 培养基(美国 Hyclone 公

司),胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司),胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),四甲基偶氮唑蓝比色(MTT,超纯级,美国 Amersco 公司),酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 R&D 公司分装),Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒(凯基公司)。逆转录试剂盒、RNAiso、Plus、Tag 酶、DNA Marker(上海宝生物公司),引物序列由上海宝生物合成。

1.2 方法

1.2.1 9HTE 细胞的培养 气道上皮细胞 9HTE 用含 10% 的 FBS DMEM 培养基(内含含有 4.0 mmol/L 谷氨酰胺,4 500 mg/L 葡萄糖)培养于 50 mL 培养瓶中,置于 37 °C,5%CO₂ 细胞培养箱中培养,每隔 1 d 换液,待细胞于对数生长期时用于试验。

1.2.2 MTT 比色法检测细胞增殖活性 取对数生长的 9HTE 细胞制成 1×10^5 /mL 接种到 96 孔细胞培养板内,每孔 150 μ L,待过夜贴壁后换无血清培养液培养 24 h,使细胞同步化于 G₀ 期。取出培养板后弃去无血清培养基,给药组加入噬菌体 D29 使得每孔终浓度分别为 10^9 、 10^7 PFU/mL(高滴度组、低滴度组),每孔终体积均为 200 μ L,以噬菌体缓冲液(phage buffer)为阴性对照孔,均设置 4 个复孔,置于 37 °C、

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81570010)。作者简介:梁梅(1984—),住院医师,硕士,主要从事呼吸系统疾病方面研究。

△ 通信作者,E-mail:guosl999@sina.com。

5%CO₂ 细胞培养箱培养,24 h 后,加入 MTT(5 g/L)每孔 20 μL 后放入 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱孵育 4 h,以 800 r/min,离心 5 min,弃去上清液,每孔加入二甲基亚砷 150 μL,轻轻振荡 10 min,使紫色结晶完全溶解后,用全波长酶标仪于 570 nm 检测吸光度(A)值,该试验重复 3 次。细胞存活率=(A_{给药组}-A_{空白组})/(A_{正常组}-A_{空白组})×100%。其中给药组为试验干预组,正常组为未做任何处理组,空白组为单纯加入 MTT 细胞培养基组。

1.2.3 ELISA 法检测细胞上清液白细胞介素(IL)-6、IL-8 分泌水平 接种处于对数生长期的 9HTE 气道上皮细胞悬液以 1×10⁵/孔接种于 24 孔细胞培养板内,每孔 500 μL 待过夜贴壁后试验组加入噬菌体 D29 使每孔的最终浓度分别为 10⁹、10⁷ PFU/mL(高滴度组、低滴度组),终体积为 1 mL,均设置 4 个复孔;以 phage buffer 为阴性对照组,脂多糖(LPS,终浓度为 10 mg/L)设置为阳性对照组,置入 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱培养,2 d 后,收集细胞上清液,3 000 r/min,离心 20 min,取上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,测上清液细胞因子 IL-6、IL-8 水平,该试验重复 3 次。

1.2.4 RT-PCR 半定量检测气道上皮细胞细胞间黏附分子-1(ICAM-1)mRNA 的表达 将对数生长的气道上皮细胞悬液以 1×10⁶/瓶接种到细胞培养瓶中,细胞过夜贴壁后加入噬菌体 D29 使每孔的终浓度分别为 10⁹、10⁷ PFU/mL(高滴度组、低滴度组),终体积为 3 mL;以 phage buffer 为阴性对照组,置入 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱培养,2 d 后按照说明书提取细胞总 RNA,反转录合成 cDNA 链,加入 Tag 酶及上、下游引物,在 PCR 仪上进行 PCR 扩增。ICAM-1 引物核苷酸序列:上游 5'-GAG TCT GCT GGG AAT TTT CTG G-3',下游 5'-GAG GTG ACA GTG AAG TGT GAG G-3',PCR 循环参数为:94 °C 30 s 变性,56 °C 30 s 退火,共反应 30 循环;β-actin 上游 5'-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT-3',下游 5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3'。PCR 循环参数为:94 °C 30 s 变性,58 °C 30 s 退火,共反应 35 循环,扩增产物琼脂糖电泳并扫描成像,计算机软件分析电泳条带灰度。

1.2.5 流式细胞仪对气道上皮细胞凋亡的检测 台盼蓝记数细胞活力大于 95%的气道上皮细胞 10⁵/孔接种于 24 孔细胞培养板,细胞贴壁后换无血清 DMEM 培养基 24 h,使细胞同步于 G₀ 期。试验组加入噬菌体 D29 使每孔终浓度分别为 10⁹、10⁷ PFU/mL(高滴度组、低滴度组),终体积为 1 mL;阴性对照组加入 phage buffer,均设 3 个复孔,刺激 48 h 后,以无二乙胺四乙酸(EDTA)的 0.25%胰蛋白酶收集上清液和底壁细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min。用无菌 PBS 洗涤 2 次,沉淀以 500 μL binding 缓冲液悬浮细胞,加入 5 μL AnnexinV-FITC 混匀后再加入 5 μL 碘化丙啶(PI),室温避光孵育 10 min 后立即用流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验,两组间比较采用独立样本 t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 高、低滴度噬菌体 D29 对 9HTE 细胞生长活性 高滴度和低滴度分别作用于气道上皮细胞 9HTE 不同时间 12、24、48 h 后,各组存活率见表 1。采用重复测量方差分析,作用时间对 9HTE 细胞无明显影响($F = 0.892, P = 0.427$);高、低滴度对细胞生长活性比较差异无统计学意义($F = 0.506, P = 0.619$);

作用时间及浓度之间不存在交互作用($F = 1.053, P = 0.408$)。

表 1 MTT 法检测 9HTE 细胞增殖存活率结果($\bar{x} \pm s, \%$)

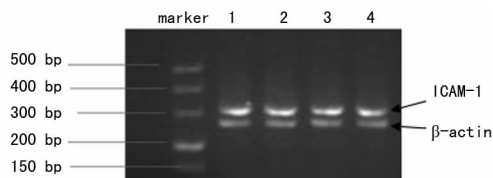
组别	12 h	24 h	48 h
高滴度组	99.170±0.420	98.768±0.626	99.245±0.427
低滴度组	99.320±0.567	98.923±0.376	99.000±0.432
阴性对照组	98.958±0.410	99.048±0.474	98.628±0.614

2.2 高、低滴度噬菌体 D29 对 9HTE 分泌细胞因子的影响

2.2.1 高、低滴度噬菌体 D29 对 9HTE 分泌 IL-6 的影响 用高、低滴度噬菌体 D29 作用于气道上皮细胞 9HTE 48 h 后,各组细胞上清液 IL-6 水平较少,高滴度组[(1.185±0.114)ng/L]、低滴度组[(1.193±0.932)ng/L]与阴性对照组[(1.238±0.443)ng/L]及正常组[(1.210±0.101)ng/L]两两比较差异无统计学意义($F = 0.257, P = 0.855$);阳性对照组[(3.788±0.048)ng/L]与正常组比较细胞因子水平明显升高,比较差异有统计学意义($t = 46.123, P = 0.000$)。

2.2.2 高、低滴度分别对 9HTE 分泌 IL-8 的影响 高滴度组[(0.632±0.042)ng/L]、低滴度组[(0.596±0.163)ng/L]细胞上清液细胞因子 IL-8 水平与阴性对照组[(0.625±0.003)ng/L]及正常组[(0.609±0.025)ng/L]比较差异无统计学意义($F = 1.568, P = 0.248$);阳性对照组[(0.817±0.016)ng/L]与正常组比较细胞因子水平升高明显,比较差异有统计学意义($t = 14.064, P = 0.000$)。

2.2.3 高、低滴度噬菌体 D29 对 9HTE 细胞表达 ICAM-1 的 mRNA 影响 高滴度组(2.76±0.27)和低滴度组(2.75±0.30)各组间 ICAM-1 mRNA 表达量与阴性对照组(2.84±0.15)和正常组(2.49±0.35)均比较差异无统计学意义($F = 0.695, P = 0.581$),见图 1。



1:高滴度组;2:低滴度组;3:阴性对照组;4:正常组。

图 1 各组 9HTE 细胞 ICAM-1 mRNA 的表达

2.2.4 流式细胞仪检测 高滴度组[(9.82±0.59)%]、低滴度组[(9.98±0.34)%]与阴性对照组[(10.09±0.32)%]、正常对照组[(10.56±0.18)%]凋亡率两两两比较差异无统计学意义($F = 1.992, P = 0.194$)。

3 讨 论

结核病耐药问题逐渐严重,故急需开发新的抗菌药物,噬菌体 D29 裂解谱广,抗原性较高,能裂解耐药结核分枝杆菌,故有望用于肺结核病特别是耐药结核病的治疗^[5]。结核病以肺部感染最多,通过课题组前期研究表明通过呼吸道给药噬菌体到达肺部量最多,药物量维持时间长^[4,6],保证其有效性,但目前国内外对噬菌体对气道上皮的功能及安全性研究甚少。

气道上皮细胞具有机械屏障作用,同时还有更重要的免疫炎症防御作用^[7],气道上皮细胞受刺激后可产生多种炎症介质,募集炎症细胞,诱发异常炎症反应,造成病理损伤^[8]。IL-6 在正常气道上皮细胞极少分泌,但在受刺激后分泌量增加,其主要功能是促进 T、B 细胞增殖活化,参与炎症反应,导致机体发热等,IL-8 是一种化学趋化因子,可趋化并激活中性粒细胞

到达炎症部位,发挥作用^[9]。而 ICAM-1 属于免疫球蛋白超家族成员之一,参与调解炎症反应,细胞和组织之间分化和发育、免疫反应应答及淋巴细胞归巢和再循环等一些重要的生理功能^[10],也是大部分血清型鼻病毒、呼吸道合胞病毒等多种病毒的受体,受到相关病毒感染时,其 ICAM-1 表达上调^[11-13]。

本试验研究结果提示:无论是高滴度或是低滴度噬菌体 D29 对气道上皮细胞分泌的 IL-6、IL-8 及气道上皮细胞的生长活性和 ICAM mRNA 的分泌均无明显影响,表明噬菌体 D29 本身不会刺激气道上皮细胞发生炎症反应,初步表明噬菌体 D29 对气道上皮细胞具有较好的安全性,但本试验仅限于体外试验,对体内试验是否安全需要进一步动物试验证明。

综上所述,噬菌体 D29 作用于人气道上皮细胞一段时间过后,对其生长及功能均无明显影响,表面噬菌体 D29 对气道上皮细胞有较好的安全性,为今后噬菌体生物制剂通过呼吸道治疗肺结核感染提供安全性依据。

参考文献

- [1] Rastogi V, Pragma, Verma N, et al. An overview on bacteriophages: a natural nanostructured antibacterial agent [J]. *Curr Drug Deliv*, 2016. DOI:10.2174/1567201813666160406115744. [Epub ahead of print].
- [2] Latz S, Wahida A, Arif A, et al. Preliminary survey of local bacteriophages with lytic activity against multi-drug resistant bacteria [J]. *J Basic Microbiol*, 2016, 56 (10): 1117-1123.
- [3] Peng L, Chen BW, Luo YA, et al. Effect of mycobacteriophage to intracellular mycobacterium smegmatis and mycobacterium tuberculosis in vitro [J]. *Respirology*, 2005, 10 Suppl: S177.
- [4] 梁梅,郭述良,张红梅,等.噬菌体 D29 不同途径给入在小鼠体内的代谢分布 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2012(5): 272-276.
- [5] 邹亭亭,刘平,罗永艾,等.分枝杆菌噬菌体 D29 的生物学特性研究及其抗耐药结核潜力的探讨 [J]. *世界科技研究与发展*, 2012, 34(2): 314-317.
- [6] 杨文慧.分枝杆菌噬菌体 D29 应用于耐药结核病治疗的探索性研究 [D]. 天津:中国人民解放军军事医学科学院, 2009.
- [7] Lloyd CM, Saglani S. Asthma and allergy: the emerging epithelium [J]. *Nat Med*, 2010, 16(3): 273-274.
- [8] Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin, master switch for allergic inflammation [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(2): 269-273.
- [9] 曹雪涛. *医学免疫学* [M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2013: 52-55.
- [10] 唐可京,李幼基,谢汕茂. ICAM-1 与 VCAM-1 的结构表达与调控 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2002, 24(3): 173-177.
- [11] Bochkov YA, Gern JE. Rhinoviruses and their receptors: implications for allergic disease [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2016, 16(4): 30.
- [12] Alves MP, Schögl A, Ebener S, et al. Comparison of innate immune responses towards rhinovirus infection of primary nasal and bronchial epithelial cells [J]. *Respirology*, 2016, 21(2): 304-312.
- [13] Liu X, Qin X, Xiang Y, et al. Progressive changes in inflammatory and matrix adherence of bronchial epithelial cells with persistent respiratory syncytial virus (RSV) infection (progressive changes in RSV infection) [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9): 18024-18040.

(收稿日期:2016-11-21 修回日期:2017-01-09)

(上接第 2023 页)

- [10] Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(2): 176-184.
- [11] Yan X, Chen YG. Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF-beta signalling [J]. *Biochem J*, 2011, 434(1): 1-10.
- [12] Dabiri G, Campaner A, Morgan JR, et al. A TGF-beta1-dependent autocrine loop regulates the structure of focal adhesions in hypertrophic scar fibroblasts [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(5): 963-970.
- [13] Aggarwal K, Massagué J. Ubiquitin removal in the TGF-beta pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(7): 656-657.
- [14] 李衍常,高媛,徐忠伟,等.蛋白质组学在去泛素化酶研究中的应用 [J]. *生物工程学报*, 2014, 30(9): 1341-1350.
- [15] DeSalle LM, Latres E, Lin D, et al. The de-ubiquitinating enzyme Unp interacts with the retinoblastoma protein [J]. *Oncogene*, 2001, 20(39): 5538-5542.
- [16] Zhang J, Zhang X, Xie F, et al. The regulation of TGF-beta/Smad signaling by protein deubiquitination [J]. *Protein Cell*, 2014, 5(7): 503-517.
- [17] Zhang L, Huang H, Zhou F, et al. RNF12 controls embryonic stem cell fate and morphogenesis in zebrafish embryos by targeting Smad7 for degradation [J]. *Mol Cell*, 2012, 46(5): 650-661.
- [18] Hou X, Wang L, Zhang L, et al. Ubiquitin-specific protease 4 promotes TNF-alpha-induced apoptosis by deubiquitination of RIP1 in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(4): 311-316.
- [19] Wang L, Zhao W, Zhang M, et al. USP4 positively regulates RIG-I-mediated antiviral response through deubiquitination and stabilization of RIG-I [J]. *J Virol*, 2013, 87(8): 4507-4515.
- [20] Hou X, Wang L, Zhang L, et al. Ubiquitin-specific protease 4 promotes TNF-alpha-induced apoptosis by deubiquitination of RIP1 in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(4): 311-316.
- [21] Zhang X, Berger FG, Yang J, et al. USP4 inhibits p53 through deubiquitinating and stabilizing ARF-BP1 [J]. *Embo J*, 2011, 30(11): 2177-2189.

(收稿日期:2016-11-22 修回日期:2017-02-10)