

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.20.004

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20230913.1350.007\(2023-09-13\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20230913.1350.007(2023-09-13))IL-33 通过 TGF- β 1/Smad3 信号通路调控 CES 诱导细胞上皮-间质转化的机制研究*梁小波, 蓝楠, 张云, 王宋平, 李玉英[△]

(西南医科大学附属医院呼吸与危重症医学科/炎症与变态反应实验室, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨 IL-33 在烟草提取物(CSE)诱导细胞上皮-间质转化(EMT)形成过程中的作用机制。**方法** 将人支气管上皮细胞(16HBE)分为对照组、CSE组、CSE+Anti-IL-33组、CSE+IL-33组,按照实验分组分别给予 PBS、5% CSE、5% CSE+Anti-IL-33(3 μ g/mL)、5% CSE+IL-33(40 ng/mL)刺激 72 h。免疫荧光检测细胞 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)荧光强度,Western blot 检测细胞 E-cadherin、Vimentin、肿瘤发生抑制蛋白 2(ST2)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、母亲信号蛋白同源物(Smad3)、磷酸化 Smad3(p-Smad3)蛋白表达。**结果** 与对照组比较,CSE 暴露后干预各组细胞 E-cadherin 蛋白表达降低,Vimentin、ST2、TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 CSE 组比较,CSE+Anti-IL-33 组 E-cadherin 蛋白表达升高,Vimentin、ST2、TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达降低,CSE+IL-33 组 E-cadherin 蛋白表达降低,Vimentin、ST2、TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达升高。**结论** IL-33 可能通过 IL-33/ST2 轴上调 TGF- β 1/Smad3 信号通路,促进 CSE 诱导细胞 EMT 的形成。**[关键词]** 白细胞介素-33;烟草提取物;上皮-间质转化;慢性阻塞性肺疾病**[中图分类号]** R563.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2023)20-3061-05Mechanism of IL-33 regulation of epithelial-mesenchymal transformation induced by cigarette smoke extract through TGF- β 1/Smad3 signaling pathway*LIANG Xiaobo, LAN Nan, ZHANG Yun, WANG Songping, LI Yuying[△]

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine/Inflammation & Allergic Diseases Research Unit, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of IL-33 in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by cigarette smoke extract. **Methods** Human bronchial epithelial cells (16HBE) were divided into the control group, the CSE group, the CSE+Anti-IL-33 group and the CSE+IL-33 group. According to the experimental groups, PBS, 5% CSE, 5% CSE+Anti-IL-33 (3 μ g/mL), 5% CSE+IL-33 (40 ng/mL) were administered for 72 h, respectively. The fluorescence intensity of E-cadherin and Vimentin was detected by immunofluorescence. The expression of E-cadherin, Vimentin, Suppression of Tumorigenicity 2 (ST2), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), Recombinant Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3 (Smad3) and phosphorylated Smad3 (p-Smad3) were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the expression of E-cadherin protein decreased and the expression of Vimentin, ST2, TGF- β 1 and p-Smad3 protein increased in the intervention groups after CSE exposure, with statistical significance ($P < 0.05$). Compared with the CSE group, the expression of E-cadherin protein in the CSE+Anti-IL-33 group was increased, Vimentin, ST2, TGF- β 1 and p-Smad3 were decreased, and the expression of E-cadherin protein in the CSE+IL-33 group was decreased. The expression of Vimentin, ST2, TGF- β 1, p-Smad3 protein was increased. **Conclusion** IL-33 may up-regulate TGF- β 1/Smad3 signaling pathway through IL-33/ST2 axis, and promote the formation of CSE-induced cell EMT.**[Key words]** interleukin-33; cigarette smoke extracts; epithelial-mesenchymal transition; chronic obstructive pulmonary disease

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81900028)。 作者简介:梁小波(1987-),主治医师,硕士,主要从事呼吸疾病相关基础研究。

[△] 通信作者, E-mail: lzhllyhy@126.com。

慢性阻塞性肺疾病(简称慢阻肺)是一种以持续存在的呼吸系统症状和气流受限为特征的慢性炎症性疾病^[1]。肺功能检查是目前诊断和评估该疾病严重程度的重要手段,香烟烟雾等导致的气道重塑在慢阻肺患者肺功能下降过程中扮演着重要角色,上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在气道重塑的发生、发展过程中也起着关键作用^[2-3]。白细胞介素(IL)-1 超家族和转化生长因子(transforming growth factor, TGF)-母亲信号蛋白同源物(mothers against decapentaplegic homologs, Smad)超家族与慢阻肺、支气管哮喘、肺纤维化等多种肺部疾病的发生、发展相关,这些肺部疾病在发生机制上都存在 EMT, IL-33 信号通路和 TGF- β 1 信号通路在 EMT 发生、发展过程中是否存在相互作用目前并不清楚^[4-6]。因此,探索 IL-33 在烟草提取物(cigarette smoke extracts, CSE)诱导 EMT 发生过程中的具体作用及 IL-33/肿瘤发生抑制蛋白 2(suppression of tumorigenicity 2, ST2)、TGF- β 1/Smad3 信号通路之间的关联,对于进一步阐明慢阻肺的潜在细胞分子机制有着重要意义。本研究探讨 IL-33 在 CSE 诱导细胞 EMT 形成过程中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人支气管上皮细胞(16HBE)来源于西南医科大学附属医院炎症与变态反应实验室;天下秀(金)香烟购自川渝中烟公司;ST2、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、Smad3、磷酸化 Smad3(phosphorylation of Smad3, p-Smad3)抗体购自英国 Abcam 公司,波形蛋白(Vimentin)、TGF- β 1、 β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;人 IL-33 抗体购自美国 R&D 公司;重组人 IL-33 购自美国 PeproTech 公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液购自上海碧云天生物技术有限公司;Western blot 检测试剂盒及 IP 裂解液购自美国 Thermo 公司;垂直电泳槽、ECL 化学发光底物、凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司;聚偏氟乙烯(PVDF)膜购自美国 Millipore 公司;二氧化碳培养箱购自日本 SANYO 公司;激光共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 CSE 制备

根据参考文献^[7]制备 CSE,依次点燃 2 支去过滤嘴香烟,负压泵吸引下香烟烟雾通过装有 4 mL PBS 的收集瓶,待烟雾溶解充分后,利用 0.22 μ m 过滤器除去大颗粒物质和细菌,1 mol/L NaOH 将 CSE 的 pH 调至 7.2~7.4。每次实验前 30 min 新鲜制备。

1.2.2 细胞培养和分组

将细胞分为对照组、CSE 组、CSE + Anti-IL-33 组、CSE + IL-33 组。根据参考文献^[7-9]进行细胞培养和刺激,细胞在含有 10% 胎牛血清的完全培养基中生长到 70% 融合度时,按照实验分组分别给予 PBS、5% CSE、5% CSE + Anti-IL-33(3 μ g/mL)、5% CSE + IL-33(40 ng/mL)刺激,继续置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养 72 h,收集细胞。

1.2.3 各组细胞 E-cadherin、Vimentin 荧光强度

各组细胞刺激 72 h 后用甲醛固定,0.2% TritonX-100 溶液作用 15 min,1% 牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 30 min,E-cadherin、Vimentin 一抗孵育过夜,二抗室温避光作用 2 h,DAPI 室温作用 5 min,激光共聚焦显微镜观察拍照后进行荧光强度分析。

1.2.4 各组细胞 E-cadherin、Vimentin、ST2、TGF- β 1、p-Smad3、Smad3 蛋白表达

刺激 72 h 后收集各组细胞,提取细胞总蛋白,根据参考文献^[7]进行 Western blot 检测,凝胶成像仪曝光并提取图片,AlphaEaseFC 软件分析目的条带相对灰度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS26.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey-Kramer 法检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞 E-cadherin、Vimentin 荧光强度比较

与对照组比较,CSE 暴露后干预各组细胞 E-cadherin 荧光强度减弱,Vimentin 荧光强度增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 CSE 组比较,CSE + Anti-IL-33 组 E-cadherin 荧光强度增强,Vimentin 荧光强度减弱,CSE + IL-33 组 E-cadherin 荧光强度减弱,Vimentin 荧光强度增强,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.2 各组细胞 E-cadherin、Vimentin、ST2 蛋白表达比较

与对照组比较,CSE 暴露后干预各组细胞 E-cadherin 蛋白表达降低,Vimentin、ST2 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 CSE 组比较,CSE + Anti-IL-33 组 E-cadherin 蛋白表达升高,Vimentin、ST2 蛋白表达降低,CSE + IL-33 组 E-cadherin 蛋白表达降低,Vimentin、ST2 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.3 各组细胞 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达比较

与对照组比较,CSE 暴露后干预各组细胞 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 CSE 组比较,CSE + Anti-IL-33 组 TGF-

$\beta 1$ 、p-Smad3 蛋白表达降低, CSE+IL-33 组 TGF- $\beta 1$ 、p-Smad3 蛋白表达升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

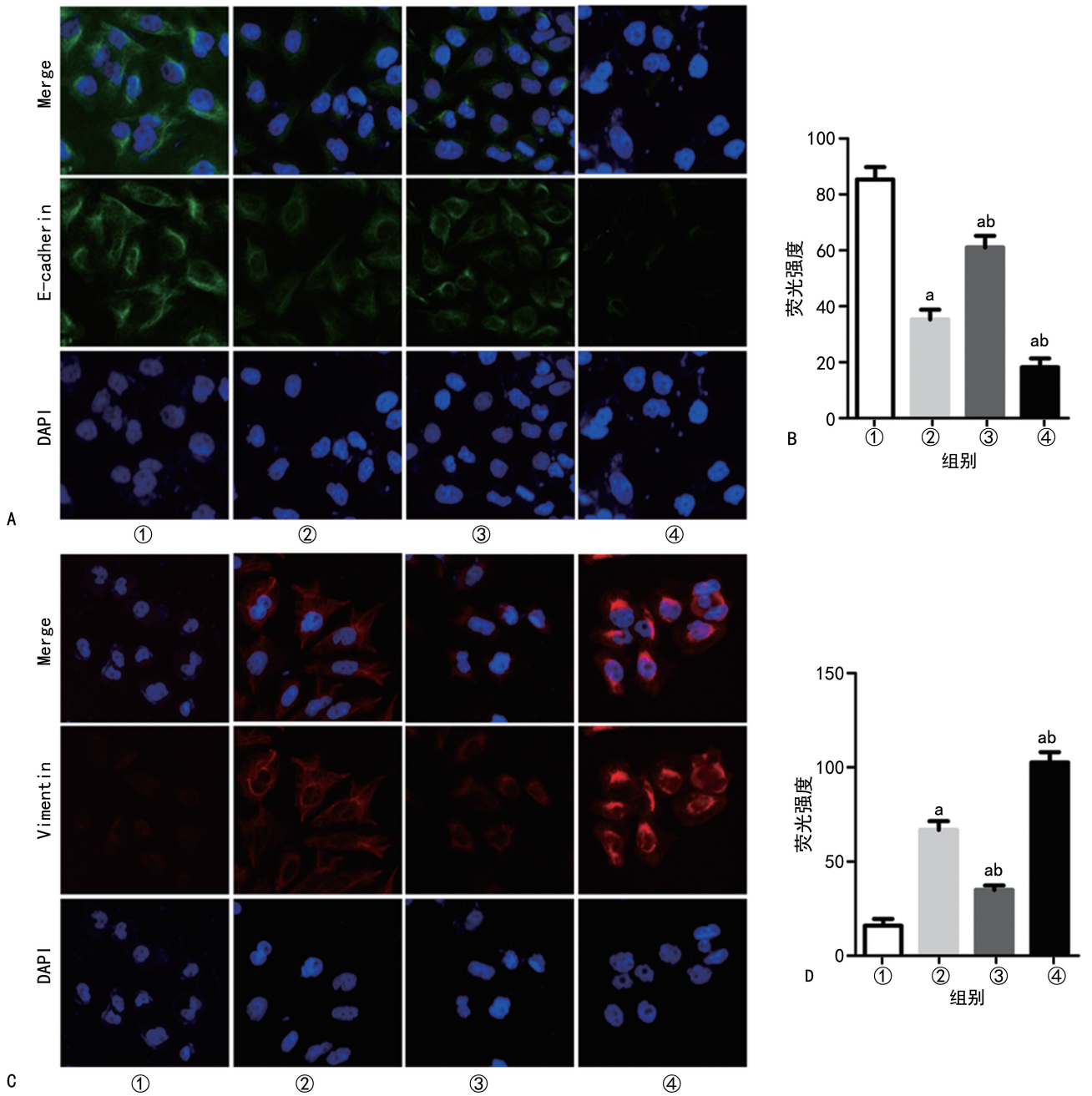


图 1 免疫荧光检测各组细胞 E-cadherin、Vimentin 荧光强度

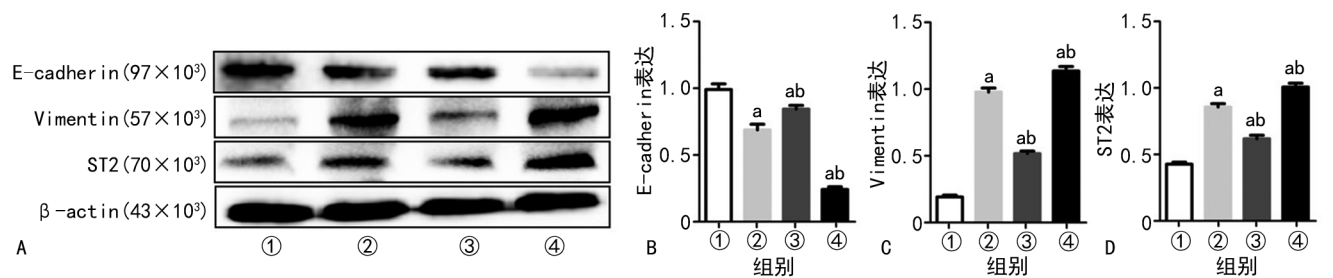
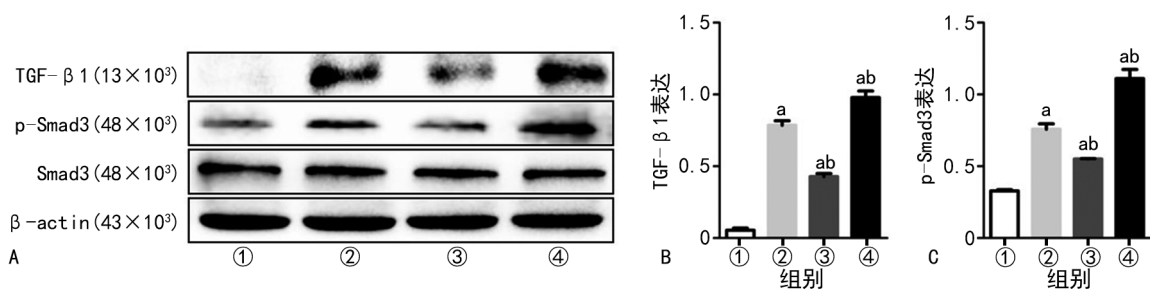


图 2 Western blot 检测各组细胞 E-cadherin、Vimentin、ST2 表达



A: Western blot 检测 TGF- β 1、p-Smad3 表达; B、C: 分别为 TGF- β 1、p-Smad3 表达水平组间比较; ①: 对照组; ②: CSE 组; ③: CSE + Anti-IL-33 组; ④: CSE + IL-33 组; ^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 CSE 组比较。

图 3 Western blot 检测各组细胞 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达

3 讨论

慢阻肺已成为全球三大死亡原因之一,吸烟仍然是慢阻肺的主要危险因素,长期暴露于香烟烟雾等有害颗粒或气体中会导致慢阻肺患者肺功能的进行性下降,严重影响患者的预后和生活质量^[1,10]。气道重塑是引起慢阻肺患者肺功能下降的重要原因之一,EMT 在气道重塑的发生、发展过程中起着关键作用^[2-3]。EMT 是由一组保守的诱导信号、转录调节器和下游效应器驱动的细胞组织从上皮表型转化为间质表型的动态过程,其中 TGF-Smad 家族的信号具有主导作用,其结果表现为 E-cadherin、Occludin 等上皮细胞蛋白表达下调,Vimentin、Fibronectin 等间质细胞蛋白表达上调,使上皮细胞顶底极性丧失、运动能力增强^[11-12]。

既往研究表明^[13-14],CSE 可以在人支气管上皮细胞、人小气道上皮细胞、II 型肺泡上皮细胞中诱导 EMT 的形成。进一步研究发现^[15],在屋尘螨提取物处理的肺泡上皮细胞中,IL-33 可以刺激 CD146 表达,进而促进慢性过敏性气道炎症的 EMT 形成。尽管 CSE 已被证实可以诱导多种肺上皮细胞 EMT 的形成,但是其在慢阻肺气道重塑中的作用机制仍未阐明。

IL-33 属于 IL-1 趋化因子超家族成员,定位于细胞核并充当基因调节因子,在细胞损伤、应激、死亡时细胞核释放,IL-33 的 N 末端被裂解后才能获得完全的生物活性,它需要与细胞膜上的 ST2 结合从而发挥促炎生物学功能^[6]。既往研究显示,在慢阻肺患者及香烟诱导的慢阻肺小鼠模型中 IL-33 和 ST2 的表达升高,而抗 IL-33 抗体可以减轻香烟诱导的慢阻肺小鼠模型病理改变^[16-17]。有研究发现,IL-33 的表达与慢阻肺患者疾病的严重程度呈正相关,与第 1 秒用力呼气容积占预计值百分比(FEV1%)呈负相关^[18]。但是 IL-33/ST2 信号通路在慢阻肺气道重塑的发生、发展过程中的作用机制尚不清楚。本研究显示,与对照组比较,CSE 暴露可以诱导细胞发生 EMT,主要表现为上皮细胞标志物 E-cadherin 荧光强度减弱,间质细

胞标志物 Vimentin 荧光强度增强,Anti-IL-33 可以抑制 CSE 诱导细胞 EMT 的改变,而 IL-33 可以促进这种变化。在 Western blot 实验中进一步验证了上述结果。同时发现,与对照组比较,CSE 暴露后细胞 IL-33 特异性受体 ST2 蛋白表达升高,Anti-IL-33 可以抑制 CSE 诱导细胞 ST2 蛋白表达,而 IL-33 可以与 CSE 协同作用进一步升高 ST2 蛋白表达。根据以上研究结果,笔者推测 IL-33 可能通过 IL-33/ST2 轴促进 CSE 诱导细胞 EMT 的形成。

TGF- β 与其胞膜受体结合后可使 Smad2/Smad3 发生磷酸化,后者与 Smad4 形成异源复合物转位入核,调节基因转录,参与调控细胞增殖、分化、迁移和凋亡^[19]。本研究结果显示,与对照组比较,CSE 暴露后细胞 TGF- β 1 及其下游信号分子 p-Smad3 蛋白表达升高,Anti-IL-33 可以明显抑制 CSE 暴露引起的 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达,IL-33 可以促进 CSE 暴露引起的 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达。根据上述实验结果,笔者推测 IL-33 信号通路与 TGF- β 1 信号通路在慢阻肺 EMT 形成过程中可能的作用机制:IL-33 可能通过上调气道上皮细胞 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达,从而促进 CSE 诱导的 EMT 形成。

综上所述,IL-33 可能通过 IL-33/ST2 轴上调 TGF- β 1/Smad3 信号通路,促进 CSE 诱导细胞 EMT 的形成,但是它们在慢阻肺患者体内是否存在着相同的作用,以及 IL-33 是否会成为慢阻肺潜在的治疗靶点还需进一步研究。

参考文献

- [1] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the Diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease [EB/OL]. [2023-04-13]. <http://www.goldcopd.org/2023-gold-report-2/>.
- [2] HOGG J C, PARÉ P D, HACKETT T L. The

- Contribution of small airway obstruction to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Physiol Rev*, 2017, 97(2): 529-552.
- [3] WALTERS E H, SHUKLA S D, MAHMOOD M Q, et al. Fully integrating pathophysiological insights in COPD: an updated working disease model to broaden therapeutic vision [J]. *Eur Respir Rev*, 2021, 30(160): 200364.
- [4] SAITO A, HORIE M, NAGASE T. TGF- β signaling in lung health and disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2460.
- [5] YI X M, LI M, CHEN Y D, et al. Reciprocal regulation of IL-33 receptor-mediated inflammatory response and pulmonary fibrosis by TRAF6 and USP38[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(10): e2116279119.
- [6] GABRYELSKA A, KUNA P, ANTCZAK A, et al. IL-33 mediated inflammation in chronic respiratory diseases-understanding the role of the member of IL-1 superfamily[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 692.
- [7] LIANG X, HE X, LI Y, et al. Lyn regulates epithelial-mesenchymal transition in CS-exposed model through Smad2/3 signaling [J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 201.
- [8] ZHOU Q, WU X, WANG X, et al. The reciprocal interaction between tumor cells and activated fibroblasts mediated by TNF- α /IL-33/ST2L signaling promotes gastric cancer metastasis[J]. *Oncogene*, 2020, 39(7): 1414-1428.
- [9] CONNOLLY D J, O'NEILL L A, MCGETTRICK A F. The GOLD domain-containing protein TMED1 is involved in interleukin-33 signaling [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(8): 5616-5623.
- [10] WANG C, XU J, YANG L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2018, 391(10131): 1706-1717.
- [11] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.
- [12] YANG J, ANTIN P, BERX G, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(6): 341-352.
- [13] SU X, CHEN J, LIN X, et al. FERMT3 mediates cigarette smoke-induced epithelial-mesenchymal transition through Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Respir Res*, 2022, 22(1): 286.
- [14] AGRAVAL H, YADAV U C S. MMP-2 and MMP-9 mediate cigarette smoke extract-induced epithelial-mesenchymal transition in airway epithelial cells via EGFR/Akt/GSK3 β / β -catenin pathway: amelioration by fisetin[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 314: 108846.
- [15] SUN Z, JI N, MA Q, et al. Epithelial-mesenchymal transition in asthma airway remodeling is regulated by the IL-33/CD146 axis [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1598.
- [16] XIA J, ZHAO J, SHANG J, et al. Increased IL-33 expression in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308(7): 619-627.
- [17] QIU C, LI Y, LI M, et al. Anti-interleukin-33 inhibits cigarette smoke-induced lung inflammation in mice[J]. *Immunology*, 2013, 138(1): 76-82.
- [18] KEARLEY J, SILVER J S, SANDEN C, et al. Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated type I interleukin-33-dependent response to infection [J]. *Immunology*, 2015, 42(3): 566-579.
- [19] TZAVLAKI K, MOUSTAKAS A. TGF- β Signaling[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(3): 487.

(收稿日期: 2023-01-28 修回日期: 2023-06-17)

(编辑: 唐 璞)