

白细胞介素-13 对人支气管上皮细胞 SPDEF 表达的影响及 SPDEF 在哮喘气道黏液高分泌中的作用

程丹 陈恒睿 王梦玫 李晓尘 王涛 胡克

[摘要] **目的** 探讨白细胞介素(IL)-13 对人支气管上皮细胞 SPDEF 表达的影响及 SPDEF 在哮喘气道黏液高分泌中的作用。**方法** 将人原代支气管上皮细胞(NHBE 细胞)分为对照组、IL-13 组及 IL-13 + SPDEF siRNA 组。培养 28 天后,收集 NHBE 细胞并提取总 RNA,采用实时荧光定量聚合酶链反应检测 NHBE 细胞 SPDEF、粘蛋白 MUC5AC 及 MUC5B mRNA 的表达水平,流式细胞术检测 MUC5AC 阳性细胞数量和免疫荧光强度,免疫荧光染色检测粘蛋白 MUC5AC 和 MUC5B 的表达水平。**结果** IL-13 组 NHBE 细胞 SPDEF 和 MUC5AC mRNA 的表达水平、MUC5AC 阳性细胞数量和免疫荧光强度均明显高于对照组($P < 0.001$),而 MUC5B mRNA 的表达水平明显低于对照组($P < 0.05$);IL-13 + SPDEF siRNA 组 NHBE 细胞 SPDEF 和 MUC5AC mRNA 的表达水平、MUC5AC 阳性细胞数量和免疫荧光强度均明显低于 IL-13 组($P < 0.001$);IL-13 + SPDEF siRNA 组 MUC5B mRNA 的表达水平明显低于对照组($P < 0.05$)。IL-13 组 NHBE 细胞 MUC5AC 的表达水平明显高于对照组和 IL-13 + SPDEF siRNA 组,而 MUC5B 的表达水平低于对照组。**结论** IL-13 可能通过诱导人支气管上皮细胞 SPDEF 上调,促进气道粘蛋白 MUC5AC 的高表达,引起哮喘气道黏液高分泌。

[关键词] 哮喘; 白细胞介素-13; SPDEF; 黏液分泌

Effects of interleukin-13 on SPDEF expression in human bronchial epithelial cells and role of SPDEF in airway mucus hypersecretion of asthma Cheng Dan^{*}, Chen Hengrui, Wang Mengmei, Li Xiaochen, Wang Tao, Hu Ke. ^{*} Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects of interleukin (IL)-13 on SPDEF expression in human bronchial epithelial cells and role of SPDEF in airway mucus hypersecretion of asthma. **Methods** Normal human bronchial epithelial (NHBE) cells were divided into control group, IL-13 group and IL-13 + SPDEF siRNA group. After 28 days of the culture, NHBE cells were collected and total RNA was extracted. Real-time polymerase chain reaction was used to detect the expression levels of SPDEF, MUC5AC and MUC5B mRNA in NHBE cells. Numbers and immunofluorescence intensity of MUC5AC positive cells were identified by flow cytometry. Expression levels of mucin MUC5AC and MUC5B were detected by immunofluorescence staining. **Results** Expression levels of SPDEF and MUC5AC mRNA, numbers and immunofluorescence intensity of MUC5AC positive cells in IL-13 group were significantly higher than those in control group ($P < 0.001$), while expression level of MUC5B mRNA was significantly lower than that in control group ($P < 0.05$). The expression levels of SPDEF and MUC5AC mRNA, numbers and immunofluorescence intensity of MUC5AC positive cells in IL-13 + SPDEF siRNA group were significantly lower than those in IL-13 group ($P < 0.001$). Expression level of MUC5B mRNA in IL-13 + SPDEF siRNA group was lower than that in control group ($P < 0.05$). The expression level of MUC5AC in NHBE cells in IL-13 group was significantly higher than those in control group and IL-13 + SPDEF siRNA group, while the expression level of MUC5B was lower than that in control group. **Conclusion** IL-13 may promote the hyperexpression of mucin MUC5AC by inducing the up-regulation of SPDEF in human bronchial epithelial cells, leading to airway mucus hypersecretion of asthma.

[Key words] Asthma; Interleukin-13; SPDEF; Mucus secretion

DOI:10.3969/j.issn.1001-9057.2020.01.016

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81600023);国家留学基金资助项目(201806275100)

作者单位:430060 武汉大学人民医院呼吸与危重症医学科(程丹、王梦玫、李晓尘、王涛、胡克);武汉科技大学医学院(陈恒睿)

通讯作者:胡克, E-mail: huke-rmhospital@163.com

黏液过度分泌是气道慢性炎症性疾病(包括支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病、支气管扩张及肺囊性纤维化等)的主要临床特征之一^[1]。气道黏液分泌过多与呼吸道感染频率增加、感染持续时间延长及肺功能下降有关^[2]。黏液栓堵塞气道也是引起致死性哮喘的主要原因^[3]。气道黏液由黏膜上皮和黏膜下腺体中的黏液分泌细胞产生,其主要来源是杯状细胞。高分子粘蛋白 MUC5AC 和 MUC5B 是气道黏液的主要组成成分,杯状细胞的过度增生和 MUC5AC 表达上调是哮喘气道黏液过度分泌的主要特征^[4]。目前已有研究结果证实,辅助性 T 细胞 2(Th2)细胞因子白细胞介素(IL)-13 介导杯状细胞增生,且在过敏原引起的气道炎症和气道黏液过度分泌中发挥重要作用^[5]。含有 SAM 尖端结构域的 ETS 转录因子(SPDEF)是粘蛋白表达的关键转录调控因子,其参与 Th2 炎症反应介导的杯状细胞分化,在调节黏液的产生过程中起关键作用^[6]。本研究通过观察 IL-13 对人支气管上皮细胞 SPDEF 表达的影响,旨在探讨 SPDEF 在哮喘气道黏液过度分泌中的作用。

材料与方法

1. 材料:人原代支气管上皮(NHBE)细胞购于美国标准生物制品收藏中心(ATCC),BEGM 培养基(瑞士 Lonza 公司)、胎牛血清(FBS)、胰酶(美国 Gibco 公司)、重组的人 IL-13 细胞因子(美国 Peprotech 公司)、转染试剂 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司)、SPDEF siRNA(中国 RiboBio 公司)、Opti-MEM 培养基、MUC5AC 抗体(美国 Thermo Fisher 公司)、MUC5B 抗体(美国 Santa Cruz 公司)、荧光二抗 488、荧光二抗 568、SPDEF、MUC5AC 及 MUC5B 引物、逆转录试剂盒、SYBR 实时荧光定量试剂(日本 TaKaRa 公司)、RNA/DNA/蛋白提取纯化试剂盒(加拿大 NORGENT 公司)。

2. 方法

(1)细胞培养和模型制作:将 NHBE 细胞均匀地种植于 6 孔板内,分为对照组、IL-13 组及 IL-13 + SPDEF siRNA 组,每组 3 孔。每孔加入 2 ml 含 10% FBS 的 BEGM 培养基,待细胞融合约 90% 左右,参照操作说明书使用转染试剂 Lipofectamine 2000 将 SPDEF siRNA 转染至 IL-13 + SPDEF siRNA 组 NHBE 细胞内,对照组和 IL-13 组均加入同体积的转染试剂 Lipofectamine 2000 + 阴性对照 siRNA 混合物,3 组均更换为无血清的 Opti-MEM 培养基。24 h 后,去除转染试剂和培养基,并将细胞转移至 Transwell 培养小室内,上层小室加 150 μ l 培养基,下层小室加 600 μ l 培养基,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内。待细胞完全融合(约 2 ~ 3 天)时,即开始细胞的

气液界面培养(去除 Transwell 培养小室的上层培养基,规律更换小室下层培养基)。从培养的第 21 天开始,在 IL-13 组和 IL-13 + SPDEF siRNA 组的下层培养基中加入人 IL-13(10 ng/ml)并持续干预细胞 7 天,至培养第 28 天时,将第 1 孔的 Transwell 细胞进行胰酶消化,收集细胞,参照 RNA/DNA/蛋白提取纯化试剂盒的说明书进行操作,提取细胞中总 RNA,置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。第 2 孔的 Transwell 细胞进行流式细胞术检测,第 3 孔的 Transwell 细胞进行固定及免疫荧光染色。

(2)实时荧光定量聚合酶链反应(real-time PCR)检测 SPDEF、MUC5AC 及 MUC5B mRNA 的表达:将提取的 3 组细胞总 RNA 分别进行浓度测定,然后按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录,合成模板 cDNA。按照 SYBR PCR 试剂盒说明书进行 real-time PCR,反应条件为:反应体系共 10 μ l,扩增条件:50 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min,共 40 个循环。

(3)流式细胞术检测 MUC5AC 阳性细胞数量和免疫荧光强度:细胞消化后计数,用新鲜配制的 4% 多聚甲醛固定液(PFA)固定,冰上放置 10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后将细胞重悬于通透液中 30 min,再孵育 MUC5AC 抗体约 1 h,并设置同型对照,上机检测。

(4)免疫荧光染色检测粘蛋白的表达水平:采用 Carnoy's 固定液将 Transwell 上层小室固定 30 min,再采用 PBS-Triton X-100 透化 20 min,5% 山羊血清封闭 30 min,加一抗于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,第 2 天避光孵育荧光二抗及 DAPI 染核,再用 1% PFA 固定,防荧光淬灭剂封片,在共聚焦显微镜下进行观察拍照。

3. 统计学处理:应用 GraphPad Prism 8.0 和 SPSS 21.0 软件进行统计分析,流式细胞数据采用 FlowJo 软件进行分析作图。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 3 组 NHBE 细胞 SPDEF、MUC5AC 及 MUC5B mRNA 表达水平的比较:IL-13 组 NHBE 细胞 SPDEF 和 MUC5AC mRNA 的表达水平均明显高于对照组($P < 0.001$),而 MUC5B mRNA 的表达水平明显低于对照组($P < 0.05$);IL-13 + SPDEF siRNA 组 NHBE 细胞 SPDEF 和 MUC5AC mRNA 的表达水平均明显低于 IL-13 组($P < 0.001$),而两组 MUC5B mRNA 的表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$);IL-13 + SPDEF siRNA 组 MUC5B mRNA 的表达水平明显低于对照组($P < 0.05$),而两组 SPDEF、MUC5AC mRNA 的表达水

平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组 NHBE 细胞 SPDEF、MUC5AC 及 MUC5B mRNA 表达水平的比较 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	SPDEF mRNA	MUC5AC mRNA	MUC5B mRNA
对照组	16.39 ± 5.34	1.32 ± 0.80	104.41 ± 10.65 ^d
IL-13 组	260.73 ± 13.68 ^{ac}	77.78 ± 7.27 ^{ac}	68.23 ± 2.30 ^b
IL-13 + SPDEF siRNA 组	11.46 ± 1.70	0.71 ± 0.43	56.23 ± 9.77

注:与对照组比较,^a $P < 0.001$,^b $P < 0.05$;与 IL-13 + SPDEF siRNA 组比较,^c $P < 0.001$,^d $P < 0.05$

2.3 组 NHBE 细胞中 MUC5AC 阳性细胞数量和免疫荧光强度比较:IL-13 组 MUC5AC 阳性细胞数量和免疫荧光强度均明显高于对照组 ($P < 0.001$);IL-13 + SPDEF siRNA 组 MUC5AC 阳性细胞数量和免疫荧光强度均明显低于 IL-13 组 ($P < 0.001$);而对照组和 IL-13 + SPDEF siRNA 组 MUC5AC 阳性细胞数量、免疫荧光强度比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组 NHBE 细胞中 MUC5AC 阳性细胞数量和免疫荧光强度比较 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	MUC5AC 阳性细胞 (个)	MUC5AC 免疫荧光强度 (MFI)
对照组	396.00 ± 66.43	143.70 ± 4.16
IL-13 组	3 236.00 ± 51.20 ^{ab}	610.00 ± 24.27 ^{ab}
IL-13 + SPDEF siRNA 组	339.70 ± 18.61	163.00 ± 12.17

注:与对照组比较,^a $P < 0.001$;与 IL-13 + SPDEF siRNA 组比较,^b $P < 0.05$

3.3 组 NHBE 细胞粘蛋白 MUC5AC 和 MUC5B 的表达水平比较:IL-13 组 NHBE 细胞 MUC5AC 的表达水平明显高于对照组,而 MUC5B 的表达水平低于对照组。IL-13 + SPDEF siRNA 组 NHBE 细胞 MUC5AC 的表达水平明显低于 IL-13 组,而 MUC5B 的表达水平较 IL-13 组无明显改变。见图 1。

讨 论

支气管哮喘是常见的慢性炎症性呼吸系统疾病,其主要特征是气道嗜酸性粒细胞炎症、气道高反应性及黏液过度分泌^[7]。通过纤毛在气道上皮细胞的移动,将病原体捕获在气道产生的黏液中,并通过纤毛的清除功能排出黏液。当黏液过度分泌时,纤毛的清除能力下降,导致黏液栓形成堵塞气道,严重时可诱发致死性哮喘^[8]。气道黏液的主要成分是上皮杯状细胞分泌的粘蛋白,杯状细胞过度增生和粘蛋白 MUC5AC 异常高表达是导致气道黏液过度分泌的主要机制之一^[9]。研究发现,哮喘患者气道上皮细胞中杯状细胞的数量大约是健康人群的 3 倍^[10]。

IL-13 是由 Th2 细胞分泌的多效性细胞因子,研究报告 IL-13 可诱导气道上皮杯状细胞过度增生和黏液过度分泌,引起气道阻塞和肺功能障碍,使用 IL-13 抑制剂或敲除编码 IL-13 的基因后,气道杯状细胞数量和粘蛋白 MUC5AC 表达水平均明显降低^[11]。SPDEF 是前列腺中表达相对丰富的 ETS 家族转录因子之一,最初被称为前列腺特异性 ETS,主要表达于气管、支气管和腺体的上皮细胞中。尘螨暴露和 IL-13 的存在可诱导 SPDEF 表达上调和杯状细胞增生,SPDEF 在 Th2 细胞因子和过敏原引起的黏液细胞增生和黏液分泌增多过程中发挥重要作用^[12-13]。

在本研究中,我们发现使用 IL-13 干预 NHBE 细胞,可诱导 SPDEF 表达上调,并明显增加 MUC5AC 的表达,但将 SPDEF siRNA 转染至 NHBE 细胞后,即使有 IL-13 的干预,上述作用仍被抑制,SPDEF 沉默导致 MUC5AC mRNA 和蛋白的表达水平进一步下调,表明成功抑制了粘蛋白的合成,进而导致气道上皮杯状细胞数量减少、黏液 MUC5AC 分泌量下降,提示 SPDEF

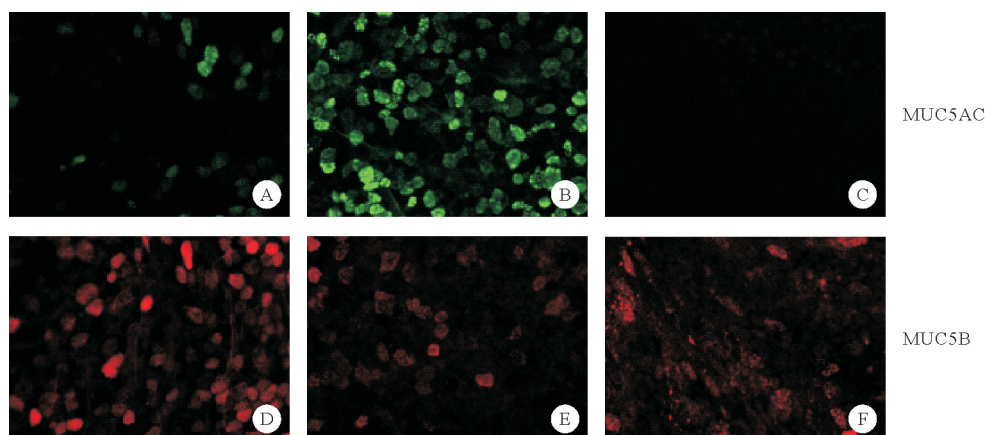


图 1 3 组 NHBE 细胞粘蛋白 MUC5AC 和 MUC5B 的表达水平比较 (MUC5AC、MUC5B 在免疫荧光染色下分别呈绿色、红色;A、D:对照组;B、E:IL-13 组;C、F:IL-13 + SPDEF siRNA 组;免疫荧光染色, ×200)

可能是 IL-13 诱导 MUC5AC 表达调控的关键因子, SPDEF 的下调降低了 IL-13 诱导的 MUC5AC 表达。众所周知, siRNA 发挥作用的原理是靶向并降解 mRNA。由于 mRNA 的不断产生, 新生的 dsRNA 需要反复合成与降解, 从而持续形成新的 siRNA, 因此, siRNA 的沉默作用一般是短暂的, 无法有效评估脱靶效应, 这也是本研究的不足之处, 在未来临床研究及应用之前, 使用 CRISPR/Cas9 系统结合特异性和靶细胞特异性进一步评估脱靶效应十分必要。

综上所述, 采用 IL-13 刺激 NHBE 细胞构建哮喘模型, 转录因子 SPDEF 和粘蛋白 MUC5AC 均明显上调, 而抑制 SPDEF 表达后, NHBE 细胞中杯状细胞的数量和黏液分泌均明显减少, 粘蛋白 MUC5AC 的表达明显下调, 而对 MUC5B 的表达无明显影响, 提示 SPDEF 是调控 IL-13 诱导 MUC5AC 过表达的关键转录因子, 可能参与了哮喘气道黏液过度分泌的发病机制, IL-13 通过诱导 SPDEF 上调, 促进气道粘蛋白 MUC5AC 的高表达, 引起哮喘气道黏液高分泌。

参 考 文 献

- [1] Button B, Anderson WH, Boucher RC. Mucus Hyperconcentration as a Unifying Aspect of the Chronic Bronchitic Phenotype[J]. Ann Am Thorac Soc, 2016, 13 Suppl 2: S156-S162.
- [2] Song JW, Seo CS, Cho ES, et al. Meso-Dihydroguaiaretic acid attenuates airway inflammation and mucus hypersecretion in an ovalbumin-induced murine model of asthma[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 31: 239-247.

- [3] Bonser LR, Zlock L, Finkbeiner W, et al. Epithelial tethering of MUC5AC-rich mucus impairs mucociliary transport in asthma[J]. J Clin Invest, 2016, 126(6): 2367-2371.
- [4] Ni ZH, Tang JH, Chen G, et al. Resveratrol inhibits mucus overproduction and MUC5AC expression in a murine model of asthma[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(1): 287-294.
- [5] Qin Y, Jiang Y, Sheikh AS, et al. Interleukin-13 stimulates MUC5AC expression via a STAT6-TMEM16A-ERK1/2 pathway in human airway epithelial cells[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 40: 106-114.
- [6] Rajavelu P, Chen G, Xu Y, et al. Airway epithelial SPDEF integrates goblet cell differentiation and pulmonary Th2 inflammation[J]. J Clin Invest, 2015, 125(5): 2021-2031.
- [7] Sung JE, Lee HA, Kim JE, et al. Saponin-enriched extract of Asparagus cochinchinensis alleviates airway inflammation and remodeling in ovalbumin-induced asthma model[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(5): 1365-1376.
- [8] Whitsett JA. Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance[J]. Ann Am Thorac Soc, 2018, 15(Supplement 3): S143-S148.
- [9] Evans CM, Raclawska DS, Ttofali F, et al. The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6281.
- [10] Yamauchi K. Airway remodeling in asthma and its influence on clinical pathophysiology[J]. Tohoku J Exp Med, 2006, 209(2): 75-87.
- [11] Suzuki I, Kawano S, Komiya K, et al. Inhibition of IL-13-induced periostin in airway epithelium attenuates cellular protein expression of MUC5AC[J]. Respirology, 2017, 22(1): 93-100.
- [12] Song J, Cano-Rodriguez D, Winkle M, et al. Targeted epigenetic editing of SPDEF reduces mucus production in lung epithelial cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 312(3): L334-L347.
- [13] Yu H, Li Q, Kolosov VP, et al. Interleukin-13 induces mucin 5AC production involving STAT6/SPDEF in human airway epithelial cells[J]. Cell Commun Adhes, 2010, 17(4-6): 83-92.

(收稿日期: 2019-07-08)

(本文编辑: 周三凤)

· 论著摘要 ·

慢性阻塞性肺疾病急性加重合并肺血栓栓塞症 12 例临床分析

李晓晨 刘先胜

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病急性加重; 肺血栓栓塞症; 诊断

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种常见的慢性呼吸系统疾病, 在我国 40 岁以上人群中的患病率高达 14%。慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)是 COPD 患者死亡的重要原因, 对患者的疾病进程、活动耐力、生活质量及社会经济负担均产生严重负面影响。急性肺血栓栓塞症(PTE)是常见的三大致死性心血管疾病之一^[1]。COPD 患者处于高凝状态、因慢性缺氧致血管内皮损伤且合并细小动脉原位血栓, 是 PTE 的独立危险因素。

AECOPD 患者 PTE 的发病率和病死率显著增高。我们通过分析 12 例 AECOPD 合并 PTE 患者的临床资料, 旨在探讨其临床特征和诊治策略。

对象与方法

1. 对象: 2015 年 1 月 ~ 2018 年 8 月于我科住院且确诊为 AECOPD 合并 PTE 的患者 12 例。根据 2018 年《中国肺血栓栓塞症诊治与预防指南》, PTE 的诊断标准如下: 在临床表现和初步检查提示 PTE 的情况下, 完善以下 4 项 PTE 确诊检查, 其中 1 项阳性即可明确诊断: CT 肺动脉造影(CTPA)、核素肺通气/灌注显像、磁共振肺动脉造影、肺动脉造影。AECOPD 的诊断标准参照 2017 年《慢性阻塞性肺疾病急性加重诊治中国专家共识》: 既往确诊 COPD 患者, 主要症状[基线呼吸困难、咳嗽和

DOI: 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.01.017

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2016YFC1304500); 国家自然科学基金资助项目(81700052)

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院呼吸与危重症医学科

通讯作者: 刘先胜, E-mail: doctorliu@126.com