

TNF- α 和IL-13对人肺成纤维细胞胶原蛋白生成的影响

陈厚文¹ 郭梦舟² 陈琦³ 吴超² 李香龙² 范杰² 熊志勇² 朱孟博³ 石小玉^{4*}

(¹南昌大学研究生院医学部, 南昌 330006; ²南昌大学第一临床医学院, 南昌 330004; ³南昌大学第二临床医学院,

南昌 330004; ⁴南昌大学基础医学院, 南昌 330006)

摘要 以胶原蛋白过量沉积为主要特征的纤维化是临床肺部疾患常见的病理现象。该研究利用RT-PCR技术检测不同剂量TNF- α 和IL-13对人肺成纤维细胞IL-13R α 1、IL-13R α 2和I型胶原蛋白转录水平的影响; ELISA检测细胞培养上清IL-13R α 2分泌量; 羟脯氨酸法定量分析各组肺成纤维细胞胶原蛋白生成情况。结果发现: 在实验剂量条件下, TNF- α 和IL-13对人肺成纤维细胞IL-13R α 1的表达无显著影响; 两者均能不同程度地上调IL-13R α 2的表达; 与对照组相比, TNF- α 对胶原蛋白的表达有下调作用, IL-13则无显著影响。

关键词 TNF- α ; IL-13; 肺成纤维细胞; 胶原蛋白

纤维化是包括间质性肺疾病、慢性阻塞性肺疾病和肺结核等在内的多种肺部疾患发生、发展过程中的一种重要病理改变。研究表明, 肺成纤维细胞激活、增生, 继而产生大量胶原蛋白沉积于细胞外基质(ECM)是肺纤维化形成的关键环节。TNF- α 和IL-13分别由Th1和Th2生成, 是参与体内免疫调节的主要细胞因子, 在纤维化、自身免疫性疾病和肿瘤的发生和发展中发挥着重要的作用。

本研究首先运用RT-PCR和ELISA技术对与肺纤维化密切相关的IL-13R α 1和IL-13R α 2表达进行检测, 进而在转录和蛋白质两个水平上对肺成纤维细胞胶原蛋白的分泌量变化进行分析, 探讨了IL-13R α 1、IL-13R α 2的表达及胶原蛋白生成的调控机制, 比较了人肺成纤维细胞对TNF- α 和IL-13的不同反应性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肺成纤维细胞HFL1购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.1.2 培养基(液) F12K培养基购自美国Invitrogen生命技术有限公司, FBS购自杭州四季青生物工程公司。

1.1.3 主要试剂 TNF- α 和IL-13购自美国Peprotech公司; 总RNA提取用Trizol购自美国Sigma-Aldrich公司; RT试剂盒、RT-PCR引物和PCR-Mix购自TaKaRa生物工程(大连)有限公司; hIL-13R α 2 ELISA试剂盒购

自美国R&D生物科学公司; 羟脯氨酸检测试剂盒(消化法)购自南京建成科技有限公司; Bradford法蛋白定量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺成纤维细胞HFL1培养于含10% FBS、100 U/ml青霉素和100 U/ml链霉素的F12K培养基中, 至细胞计数约 10^7 /ml或融合度约80%左右时血清饥饿24 h。对照组加入等体积PBS, 实验组分别加入不同剂量TNF- α 和IL-13刺激24 h后收集上清液和总RNA。

1.2.2 IL-13R α 1、IL-13R α 2和I型胶原蛋白转录水平检测 Trizol法裂解各组细胞(DNase I分解混入的基因组DNA), 苯酚/氯仿抽提及无水乙醇沉淀法纯化总RNA样本。以 D_{260}/D_{280} 比值(各样品测三次取平均值)计算RNA含量后, 将所有总RNA样本用RNase Free dH₂O定量至25 μ g/ μ l逆转录。根据NCBI全基因组序列, 利用Primer Premier 5.0软件设计IL-13R α 1、IL-13R α 2和I型胶原蛋白特异性引物。按相关体系方案将目的基因引物与内参引物在同等条件下PCR后, 1.2%琼脂糖凝胶电泳观察目的基因和内参表达情况(PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C 60 s, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50.4–59.0 $^{\circ}$ C 30 s,

收稿日期: 2010-12-16 接受日期: 2011-02-10

国家自然科学基金(No.30860118)、国家大学生创新性实验计划(No.091040306, No.101040307)和江西省研究生创新专项基金(No. Yc09a011)资助项目

*通讯作者。Tel: 0791-6362180, Fax: 0791-6361272, E-mail: shixiaoyu999@163.com

72 °C 90 s, 30个循环, 72 °C 7 min)。

1.2.3 ELISA检测可溶型IL-13Rα2(sIL-13Rα2)含量 收集空白对照组和各实验组细胞培养上清液, 根据试剂盒使用说明孵育和显色, 测450 nm波长条件下吸光度值(每个刺激点设3个平行对照, 每个对照设3个复孔取平均值)。Excel软件辅助建立标准曲线并计算各样本D值所对应的sIL-13Rα2含量。

1.2.4 羟脯氨酸定量检测 收集空白对照组和各实验组细胞培养上清液(同ELISA样本), 以1.0% BSA标准品倍比稀释绘制标准曲线, Bradford法总蛋白含量测定后按酶消化法处理样本, DDW调零后取上清在550 nm处1 cm光径测各比色皿吸光度值(每个刺激点

设3个平行对照, 每个对照测3次取平均值)。计算公式: 羟脯氨酸量=[(测定管吸光度-空白管吸光度)×(标准管吸光度-空白管吸光度)]×标准管浓度÷蛋白含量。单位: 微克每毫克蛋白质(μg/mg_{protein})。

1.2.5 统计学分析 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用SPSS16.0统计软件对实验组和对照组数据进行方差分析和t检验, *P<0.05为差异有统计学意义, **P<0.01为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 IL-13Rα1表达

如图1A和图1C所示, TNF-α和IL-13各组不同剂

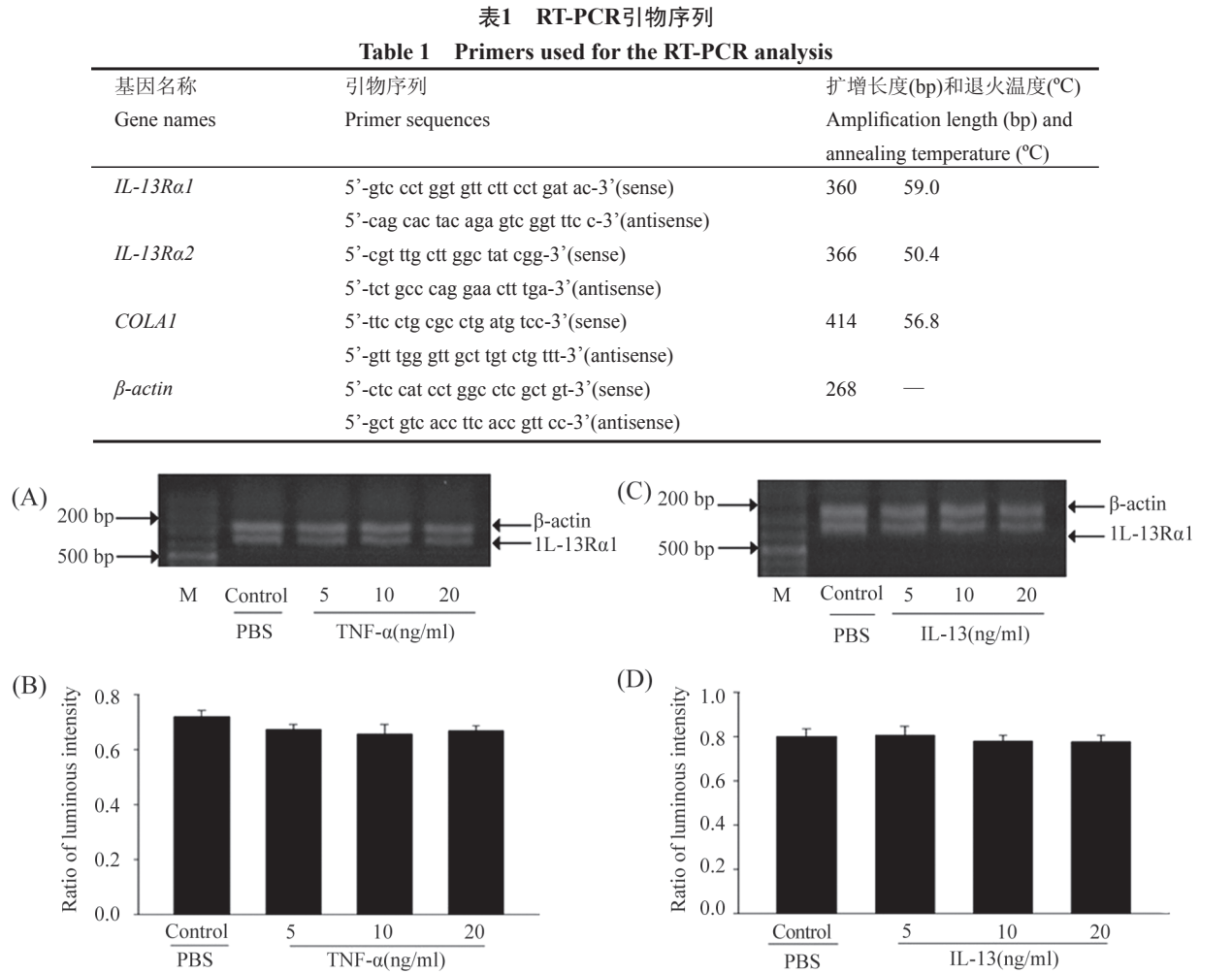


图1 HFL1细胞中TNF-α和IL-13对IL-13Rα1表达的影响

A: TNF-α不同剂量刺激HFL1细胞24 h后 IL-13Rα1 mRNA表达水平; B: TNF-α组IL-13Rα1与β-actin电泳条带光密度比率; C: IL-13不同剂量刺激HFL1细胞24 h后 IL-13Rα1 mRNA表达水平; D: IL-13组IL-13Rα1与β-actin电泳条带光密度比率。

Fig.1 Effects of TNF-α and IL-13 on IL-13Rα1 mRNA expression in HFL1 cells

A: expression of IL-13Rα1 mRNA after stimulated by TNF-α in different concentrations after 24 h on HFL1; B: luminous intensity ratios of TNF-α/IL-13Rα1 to β-actin. Agarose gel electrophoresis bands were analyzed by BandScan 5.0 software; C: expression of IL-13Rα1 mRNA after stimulated by IL-13 in different concentrations after 24 h on HFL1; D: luminous intensity ratios of IL-13/IL-13Rα1 to β-actin. Agarose gel electrophoresis bands were analyzed by BandScan 5.0 software.

量刺激HFL1细胞后IL-13R α 1凝胶电泳条带亮度与对照组相当;图1B和图1D显示各泳道光密度值与内参光密度值比例经统计学处理后无显著差异。

2.2 IL-13R α 2表达

2.2.1 IL-13R α 2 mRNA水平表达 如图2A所示,

对照组未见IL-13R α 2目的基因条带, TNF- α /IL-13R α 2各泳道凝胶电泳条带亮度随剂量增加而加强;图2B显示与内参电泳条带光密度值相比, TNF- α /IL-13R α 2各组较对照组有显著性差异, 且TNF- α /IL-13R α 2组间光密度值比例随TNF- α 剂量的增加逐渐增高。如

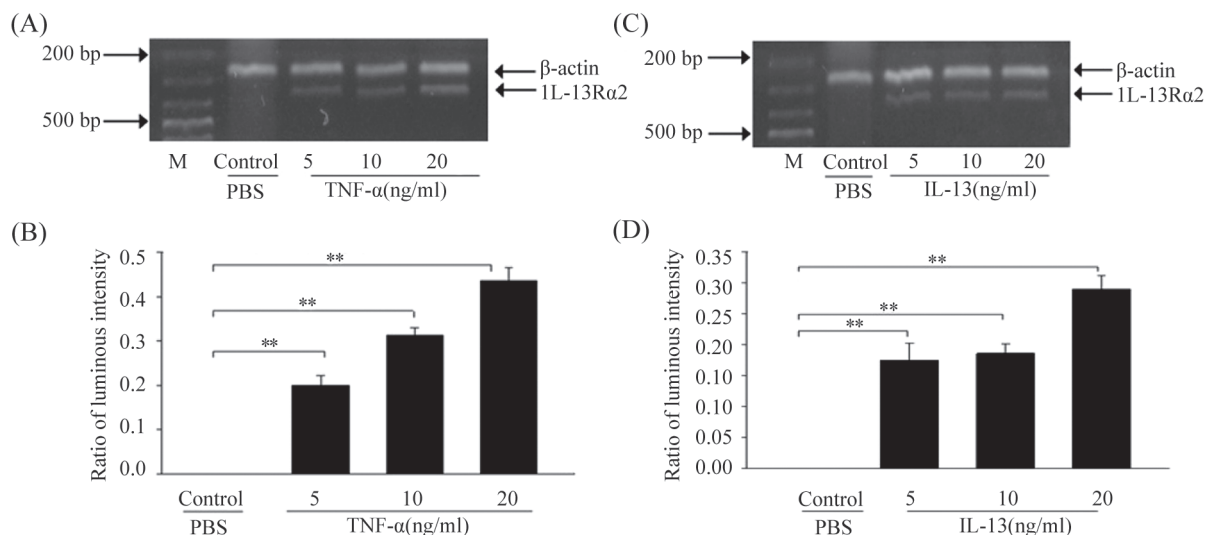


图2 HFL1细胞中TNF- α 和IL-13对IL-13R α 2 mRNA表达的影响

A: TNF- α 不同剂量刺激HFL1细胞24 h后IL-13R α 2 mRNA表达水平; B: TNF- α 组IL-13R α 2电泳条带与 β -actin电泳条带光密度比率; C: IL-13不同剂量刺激HFL1细胞24 h后IL-13R α 2 mRNA表达水平; D: IL-13组IL-13R α 2电泳条带与 β -actin电泳条带光密度比率。

Fig.2 Effects of TNF- α and IL-13 on IL-13R α 2 mRNA expression in HFL1 cells

A: expression of IL-13R α 2 mRNA after stimulated by TNF- α in different concentrations after 24 h on HFL1; B: luminous intensity ratios of TNF- α /IL-13R α 2 to β -actin. Agarose gel electrophoresis bands were analyzed by BandScan 5.0 software; C: expression of IL-13R α 2 mRNA after stimulated by IL-13 in different concentrations after 24 h on HFL1; D: luminous intensity ratios of IL-13/IL-13R α 2 to β -actin. Agarose gel electrophoresis bands were analyzed by BandScan 5.0 software.

图2C所示, 对照组未见IL-13R α 2目的基因条带, IL-13/IL-13R α 2各泳道凝胶电泳条带亮度随剂量增加而加强;图2D显示与内参电泳条带光密度值相比, IL-13/IL-13R α 2各组较对照组有显著性差异, 且IL-13/IL-13R α 2组间光密度值比例随IL-13剂量的增加逐渐增高。

2.2.2 sIL-13R α 2 ELISA定量分析 如图3所示, 对照组上清液未检出sIL-13R α 2; TNF- α 组sIL-13R α 2含量随TNF- α 刺激强度增加而逐渐上升; IL-13组sIL-13R α 2含量随IL-13剂量增加而增长。同等剂量下, TNF- α 对sIL-13R α 2含量的上调作用强于IL-13。

2.3 I型胶原蛋白表达

2.3.1 I型胶原 mRNA水平表达 如图4A所示, TNF- α 组I型胶原蛋白条带均弱于对照组, 且条带亮度与TNF- α 剂量基本呈负相关;图4B所示TNF- α 组I型胶

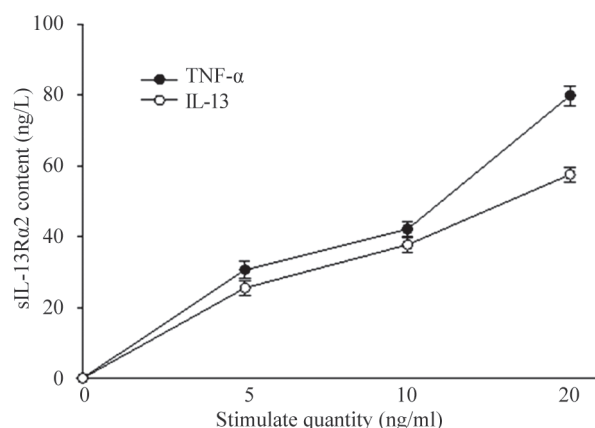


图3 细胞培养上清液可溶型IL-13R α 2含量测定

ELISA检测对照组、TNF- α 和IL-13不同剂量组刺激HFL1细胞24 h后细胞培养上清液中可溶型IL-13R α 2含量。

Fig.3 sIL-13R α 2 content in culture supernatant

PBS, TNF- α and IL-13 induced expression of sIL-13R α 2 in HFL1 after 24 h of stimulation.

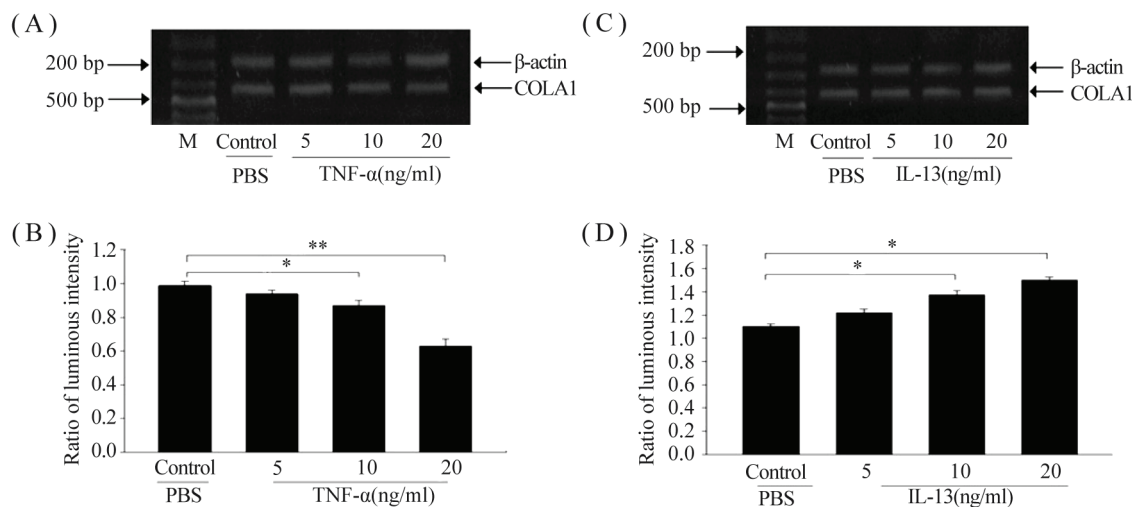


图4 TNF-α和IL-13对COLA1表达的影响

A: TNF-α不同剂量刺激HFL1细胞24 h后 I型胶原蛋白(COLA1) mRNA表达水平; B: TNF-α组I型胶原蛋白(COLA1) 电泳条带与β-actin电泳条带光密度比率; C: IL-13不同剂量刺激HFL1细胞24 h后 I型胶原蛋白(COLA1) mRNA表达水平; D: IL-13组I型胶原蛋白(COLA1) 电泳条带与β-actin电泳条带光密度比率。

Fig.4 Effects of TNF-α and IL-13 on collagen type one (COLA1) mRNA expression in HFL1 cells

A: expression of collagen type one (COLA1) mRNA after stimulated by TNF-α in different concentrations after 24 h on HFL1; B: luminous intensity ratios of TNF-α/collagen type one (COLA1) to β-actin. Agarose gel electrophoresis bands were analyzed by BandScan 5.0 software; C: expression of Collagen type one (COLA1) mRNA after stimulated by IL-13 in different concentrations after 24 h on HFL1; D: luminous intensity ratios of IL-13/ Collagen type one (COLA1) to β-actin. Agarose gel electrophoresis bands were analyzed by BandScan 5.0 software.

原蛋白与内参电泳条带光密度比值变化趋势与图4A图基本一致。如图4C所示, IL-13组I型胶原蛋白条带与对照组相比略有上升; 图4D所示IL-13组I型胶原

蛋白与内参电泳条带光密度比值逐渐增加, 10 ng/ml和20 ng/ml组与对照组相比差异有统计学意义。

2.3.2 羟脯氨酸定量检测 如图5所示, 羟脯氨酸

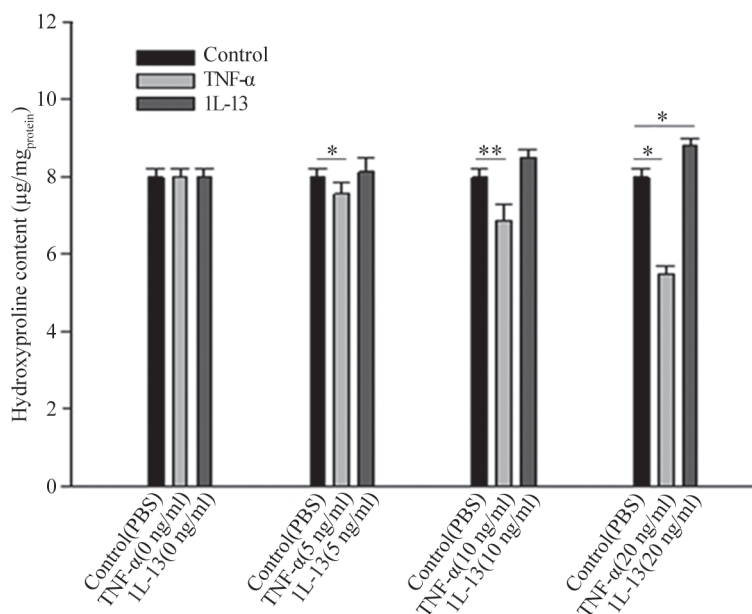


图5 羟脯氨酸法胶原蛋白定量检测

羟脯氨酸法检测对照组、TNF-α和IL-13不同剂量组刺激HFL1细胞24 h后细胞培养上清液胶原蛋白分泌量。

Fig.5 Analysis of collagen content by hydroxyproline assay

PBS, TNF-α and IL-13 induced synthesizing of collagen in HFL1 after 24 h of stimulation.

酸(消化法)法检测各组上清液中溶解的胶原蛋白含量。对照组为7.98 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{protein}}$; TNF- α 组胶原蛋白含量随TNF- α 剂量增加而逐渐减少; IL-13组胶原蛋白含量5 ng/ml和10 ng/ml组与对照组相当, 20 ng/ml组高于对照组, 且两者差异有统计学意义。

3 讨论

肺纤维化是多种肺部疾病发生、发展过程中常见的病理变化。尽管早期的炎症浸润和胶原分泌有利于免疫反应和组织修复, 但细胞外基质(ECM)的过度沉积可导致肺组织结构的形态重塑甚至功能失常, 严重时不可逆的肺纤维化甚至引起呼吸功能的衰竭以致死亡。研究表明, 正常人体内胶原蛋白的含量受到复杂机制的精细调控, 合成与分解代谢处于动态平衡状态; 病理条件下以胶原蛋白为主的细胞外基质合成与降解失衡可最终导致纤维化的发生。研究证实, 肺成纤维细胞是肺纤维化时过量ECM的主要来源, Th1/Th2免疫平衡失调是导致肺成纤维细胞激活、增殖的重要因素^[1-3]。

TNF- α 主要由Th1和单核巨噬细胞产生, 在成纤维细胞增生和程序性死亡、激活等过程中具有多向调节作用。TNF- α 过表达可抑制TGF- β 和博来霉素介导的肺纤维化^[4], 也可上调上皮细胞IL-4R α ^[5]的表达。后者可与IL-13和IL-4结合介导纤维化作用, 提示不同条件下机体对TNF- α 的反应性存在差异。IL-13是Th2细胞分泌的细胞因子, 可阻断TNF- α 介导的NF- κ B和AP-1激活与转录, 进而减弱由其调控的细胞毒性和凋亡作用^[6], 还可通过诱导上皮细胞凋亡和肺成纤维细胞胶原生成相关因子^[7]在纤维化的发生和发展中发挥免疫调节作用。

IL-13有两种结构和功能截然不同的受体: IL-13R α 1和IL-13R α 2。IL-13R α 1通过与IL-4R α 结合形成IL-13R α 1-IL-4R α 复合物参与IL-13的促纤维化作用^[8]。IL-13R α 2与IL-13的结合能力是IL-13R α 1的5 000倍^[9], 有可溶型sIL-13R α 2、膜表面型mIL-13R α 2和胞内型三种可相互转变的存在方式^[10]。大部分正常组织不表达或仅表达低水平的IL-13R α 2^[11], 而纤维化组织器官中IL-13R α 2常呈持续性高表达状态^[12]。由于IL-13R α 2的胞内区很短, 缺乏直接结合信号转导分子的能力, 目前, 认为它主要以“decoy receptor”的形式抑制IL-13的生

物学作用^[13-15], 其中, 可溶型sIL-13R α 2是发挥抑制作用的主要因子^[16]。

鉴于目前国内外研究现状和细胞资源条件, 我们以成人肺纤维化为研究主题, 选取正常人肺成纤维细胞HFL1细胞系为研究对象。结果发现, 肺成纤维细胞正常情况下不表达IL-13R α 2, 而TNF- α 和IL-13在不改变IL-13R α 1表达水平的同时均能以剂量依赖的方式介导IL-13R α 2的表达(更为灵敏的real-time PCR分析有待进一步研究); 羟脯氨酸实验显示TNF- α 刺激组胶原蛋白含量低于对照组, 且随TNF- α 剂量的增加下调效应逐渐增强, 与此同时IL-13各剂量组胶原水平较对照组无显著改变。对于和对照组相比TNF- α 组和IL-13组之间存在的胶原蛋白表达差异, 我们认为一方面TNF- α 可能通过抑制细胞增殖或其它机制下调了肺成纤维细胞的胶原蛋白生成; 另一方面IL-13可能因为介导了高配体亲和性的IL-13R α 2表达, 后者与IL-13R α 1竞争性结合IL-13, 阻断了IL-13/IL-13R α 1-IL-4R α 介导的促纤维化效应, 导致促/抑纤维化作用相互抵消。对于ELISA检测结果, 我们认为IL-13各刺激组sIL-13R α 2含量低于平行的TNF- α 组, 除可能存在的调节能力差异外, 另一可能原因也许是部分IL-13与sIL-13R α 2结合形成复合物而未能被传统方法检测出, 致使这一部分含量被遗漏。此外, 由于TNF- α 能介导IL-13R α 2的表达, 后者作为“decoy receptor”能够抑制IL-13的致纤维化效应, 在体内以TNF- α 为代表的Th1分泌的细胞因子可能通过上调IL-13R α 2等Th2细胞因子的抑制性受体而拮抗细胞外基质的过度沉积以及纤维化的产生。由于正常肺成纤维细胞不表达IL-13R α 2, 较低水平IL-13介导的IL-13R α 2表达也许是机体负反馈调控的一种表现。尽管此时细胞外基质及胶原蛋白的含量与正常情况相比还没有发生显著变化, 但受到刺激和活化的肺成纤维细胞已经表现出自我调控的迹象, 这对于尚未有临床症状的纤维化早期改变或许是一个有意义的诊断体征。

综上所述, 我们通过对TNF- α 和IL-13作用于肺成纤维细胞后IL-13R α 1、IL-13R α 2以及胶原蛋白表达的检测, 为进一步研究Th1/Th2免疫反应在调节肺成纤维细胞胶原蛋白生成中的作用以及肺纤维化早期临床诊断提供了新的实验依据和理论参考。

参考文献(References)

- 1 Boulay JL, O'Shea JJ, Paul WE. Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. *Immunity* 2003; 19: 159-63.
- 2 Relova AJ, Kampf C, Roomans GM. Effects of Th2 type cytokines on human airway epithelial cells: Interleukins-4, -5, and -13. *Cell Biol Int* 2001; 25(6): 563-6.
- 3 Wynn TA. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 583-94.
- 4 Fujita M, Shannon JM, Morikawa O, Gauldie J, Hara N, Mason RJ. Overexpression of tumor necrosis factor- α diminishes pulmonary fibrosis induced by bleomycin or transforming growth factor- β . *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 669-76.
- 5 Lugli SM, Feng N, Heim MH, Adam M, Schnyder B, Etter H, *et al.* Tumor necrosis factor α enhances the expression of the interleukin (IL)-4 receptor α -chain on endothelial cells increasing IL-4 or IL-13-induced stat6 activation. *J Biol Chem* 1997; 272(9): 5487-94.
- 6 Borowski A, Kuepper M, Horn U, Knüpfen U, Zissel G, Höhne K. Interleukin-13 acts as an apoptotic effector on lung epithelial cells and induces pro-fibrotic gene expression in lung fibroblasts. *Clin Exp Allergy* 2008; 38(4): 619-28.
- 7 Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim YK, Chen NY, Cohn L, *et al.* Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* 2004; 304: 1678-82.
- 8 Zheng T, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Chen Q, Homer RJ, *et al.* Cytokine regulation of IL-13R α 2 and IL-13R α 1 *in vivo* and *in vitro*. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 720-8.
- 9 Lupardus PJ, Birnbaum ME, Garcia KC. Molecular basis for shared cytokine recognition revealed in the structure of an unusually high affinity complex between IL-13 and IL-13R α 2. *Structure* 2010; 18(3): 332-42.
- 10 Chen W, Sivaprasad U, Tabata Y, Gibson AM, Stier MT, Finkelman FD, *et al.* IL-13R α 2 membrane and soluble isoforms differ in human and mouse. *J Immunol* 2009; 183(12): 7870-6.
- 11 Kawakami K, Kawakami M, Snoy PJ, Husain SR, Puri RK. *In vivo* over expression of IL-13 receptor α 2 chain inhibits tumorigenicity of human breast and pancreatic tumors in immunodeficient mice. *J Exp Med* 2001; 194(12): 1743-54.
- 12 Kawakami K, Terabe M, Kioi M, Berzofsky JA, Puri RK. Intratumoral therapy with IL13-PE38 results in effective CTL-mediated suppression of IL-13R α 2 expressing contralateral tumors. *Clin Cancer Res* 2006; 12(15): 4678-86.
- 13 Andrews AL, Nasir T, Bucchieri F, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE. IL-13 receptor α 2: A regulator of IL-13 and IL-4 signal transduction in primary human fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 858-65.
- 14 Zhao Y, He D, Zhao J, Wang L, Leff AR, Spannhake EW, *et al.* Lysophosphatidic acid induces interleukin-13 (IL-13) receptor α 2 expression and inhibits IL-13 signaling in primary human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 10172-9.
- 15 Zheng T, Liu W, Oh SY, Zhu Z, Hu B, Homer RJ, *et al.* IL-13 receptor α 2 selectively inhibits IL-13-induced responses in the murine lung. *J Immunol* 2008; 180: 522-9.
- 16 Khodoun M, Lewis CC, Yang JQ, Orekov T, Potter C, Wynn T, *et al.* Differences in expression, affinity, and function of soluble (s) IL-4R α and sIL-13R α 2 suggest opposite effects on allergic responses. *J Immunol* 2007; 179: 6429-38.

Effects of TNF- α and IL-13 on Collagen Synthesizing of Human Lung Fibroblast

Hou-Wen Chen¹, Meng-Zhou Guo², Qi Chen³, Chao Wu², Xiang-Long Li²,
Jie Fan², Zhi-Yong Xiong², Meng-Bo Zhu³, Xiao-Yu Shi^{4*}

(¹Department of Medicine, Graduate School of Nanchang University, Nanchang 330006, China; ²The First Clinical Medical School of Nanchang University, Nanchang 330006, China; ³The Second Clinical Medical School of Nanchang University, Nanchang 330006, China; ⁴The Basic Medical School of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract Interstitial fibrosis, characterized by excessive collagen accumulation, is a pathological hallmark of chronic pulmonary diseases. In this study, gene expression alterations of IL-13R α 1, IL-13R α 2 and collagen type one were monitored by RT-PCR in human lung fibroblasts response to the treatment of various dosages of TNF- α and IL-13, sIL-13R α 2 secreted in culture medium was quantitated by ELISA and collagen synthesized in cells was determined by hydroxyproline-assaying. We found that, IL-13R α 2, but not IL-13R α 1, was upregulated significantly in human lung fibroblasts at both mRNA and protein levels by the treatment of both TNF- α and IL-13. However, collagen synthesis in human lung fibroblasts was inhibited only by TNF- α treatment.

Key words TNF- α ; IL-13; human lung fibroblast; collagen

Received: December 16, 2010 Accepted: February 10, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30860118-C0711), the National Undergraduate's Innovative Experiment Project of China (No.091040306, No.101040307) and the Graduate Innovative Foundation of Jiangxi Province (No.Yc09a011)

*Corresponding author. Tel: 86-791-6362180, Fax: 86-791-6361272, E-mail: shixiaoyu999@163.com