

脂多糖诱导 SPLUNC1 基因的表达

肖丁良 钟礼立 高喜容

作者单位: 410007 湖南长沙, 湖南省儿童医院新生儿科(肖丁良, 高喜容); 湖南长沙, 湖南省人民医院儿科(钟礼立)

通讯作者: 肖丁良, Email: xjds8902@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2017.03.013

【摘要】 目的 了解脂多糖(LPS)对人支气管上皮细胞(HBECs)增殖的影响,通过观察不同浓度脂多糖(LPS)不同时间诱导 HBECs 的短上腭、肺及鼻咽上皮克隆 1(SPLUNC1)基因表达情况,探讨 SPLUNC1 在呼吸道感染中的作用。方法 采用 0.01、0.1、1.0、10 mg/L LPS 诱导 HBECs,通过噻唑蓝(MMT)法检测 LPS 对 HBECs 增殖的影响,诱导 HBECs 2、4、8、16、24 h 后通过实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测 SPLUNC1 基因表达情况,结果以 SPLUNC1/GAPDH 基因拷贝数比值表示。结果 0.01、0.1、1.0、10 mg/L 的 LPS 均可抑制 HBECs 的生长[吸光度(A 值): 0.48 ± 0.03 、 0.37 ± 0.01 、 0.30 ± 0.03 、 0.27 ± 0.02],相对生长指数: 94.12%、72.55%、58.82%、52.94%],并能诱导 SPLUNC1 基因表达上调;在同一浓度组, LPS 刺激细胞 2 h 后 SPLUNC1 基因表达开始上调,随着时间延长逐渐升高,呈时间依赖性[0.01 mg/L 组 2、4、8、16、24 h 分别为 0.19 ± 0.03 、 0.24 ± 0.04 、 0.26 ± 0.03 、 0.44 ± 0.05 、 0.51 ± 0.07 ; 0.1 mg/L 组分别为 0.43 ± 0.02 、 0.52 ± 0.05 、 0.60 ± 0.06 、 0.63 ± 0.08 、 0.68 ± 0.05 ; 1.0 mg/L 组分别为 0.44 ± 0.02 、 0.48 ± 0.02 、 0.50 ± 0.03 、 0.58 ± 0.05 、 0.70 ± 0.06 ; 10 mg/L 组分别为 0.34 ± 0.03 、 0.38 ± 0.04 、 0.68 ± 0.05 、 0.96 ± 0.08 、 0.98 ± 0.07],不同时间点组间比较差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。结论 LPS 可抑制 HBECs 的生长,能诱导 HBEC 细胞 SPLUNC1 基因表达上调,并在一定浓度范围内表达呈时间依赖性,推测 SPLUNC1 可能参与细菌感染最初的防御。

【关键词】 脂多糖; 人支气管上皮细胞; 短上腭、肺及鼻咽上皮克隆 1

SPLUNC1 gene expression induced by lipopolysaccharide

Xiao Dingliang, Zhong Lili, Gao Xirong. Children's hospital neonatal of Hunan Province, People's Hospital Pediatrics of Hunan Province, Changsha 410007, Hunan, China

Corresponding author: Xiao Dingliang, Email: xjds8902@126.com

【Abstract】 Objective To study the effects of lipopolysaccharide (LPS) on the growth of human bronchial epithelial cells (HBECs). To observe the expression of short palate lung and nasal epithelium clone 1 (SPLUNC1) at different time points after being induced by LPS of different concentration in HBECs. To explore the role of SPLUNC1 in respiratory tract infection. **Methods** The expression of SPLUNC1 gene in HBECs at different time points (2, 4, 8, 16, 24 hours after LPS simulated) induced by different concentrations of LPS (0.01, 0.1, 1.0, 10 mg/L) was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR), and the growth of HBECs was detected. SPLUNC1 gene level results were demonstrated by SPLUNC1/GAPDH gene copies ratio. **Results** LPS inhibited the growth of HBECs [absorbance (A) value: 0.48 ± 0.03 , 0.37 ± 0.01 , 0.30 ± 0.03 , 0.27 ± 0.02 , relative growth index: 94.12%, 72.55%, 58.82%, 52.94%], and induced the expression of SPLUNC1 gene; in the same concentration group, SPLUNC1 gene expression began to increase after 2 hours stimulation of LPS, with the prolongation of time gradually increased in a time dependent manner (0.01 mg/L group on 2, 4, 8, 16, 24 hours were 0.19 ± 0.03 , 0.24 ± 0.04 , 0.26 ± 0.03 , 0.44 ± 0.05 , 0.51 ± 0.07 , respectively; 0.1 mg/L group were 0.43 ± 0.02 , 0.52 ± 0.05 , 0.60 ± 0.06 , 0.63 ± 0.08 , 0.68 ± 0.05 , respectively; 1.0 mg/L group were 0.44 ± 0.02 , 0.48 ± 0.02 , 0.50 ± 0.03 , 0.58 ± 0.05 , 0.70 ± 0.06 , respectively; 10 mg/L group 0.34 ± 0.03 , 0.38 ± 0.04 , 0.68 ± 0.05 , 0.96 ± 0.08 , 0.98 ± 0.07 , respectively). There was statistical significance difference between the two groups at different time points (all $P < 0.01$). **Conclusions** LPS can reduce the growth of HBECs induced by LPS, increase the expression of SPLUNC1 gene, and its expression is time-dependent in a certain range. It is speculated that SPLUNC1 may be involved in the initial defense of bacterial infection.

【Key words】 Lipopolysaccharide; Human bronchial epithelial cells; Short palate lung and nasal epithelium clone 1

革兰阴性(G^-)菌是儿童呼吸道感染常见病原菌^[1];也是医院感染主要病原菌^[2]。 G^- 菌对抗菌药

物耐药性逐年增加,除合理选择抗菌药物降低耐药性外,还应研发新型抗菌药物、寻找其他抗菌物质。

黏膜分泌蛋白人上腭、肺及鼻咽上皮癌相关蛋白(PLUNC)家族是呼吸道的先天免疫防御物质,在保护呼吸道正常的生理功能中起重要作用,而短上腭、肺及鼻咽上皮克隆 1(SPLUNC1)是其家族中高表达于呼吸道并参与先天免疫应答的蛋白分子。目前对 SPLUNC1 作用机制和功能的研究还没有一致的定论,但大多认为它参与了呼吸道抵御病原菌的先天免疫应答,且很有可能拥有抑菌、杀菌的作用,可能成为将来抗菌药物耐药压力下的另一种抗菌物质选择方案。

SPLUNC1 是高表达于呼吸道上皮并参与固有免疫的蛋白分子。鉴于 SPLUNC1 表达的组织特异性,且能结合 G⁻ 菌脂多糖(LPS),并具有杀灭细菌的作用。且实时荧光聚合酶链反应(FQ-PCR)技术简便、快捷、灵敏度高、特异性强,在临床上应用广泛,具有较高的应用价值^[3-4]。故本研究选择 G⁻ 菌死亡后释放的毒力产物 LPS,通过 FQ-PCR 方法检测不同浓度 LPS 诱导人支气管上皮细胞(HBECs)不同时间 SPLUNC1 表达的变化,为以后人工调控其分泌、防治呼吸道感染进行前期研究,为防治儿童呼吸道感染提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料 LPS 购于美国 Sigma 公司;HBECs 购于湘雅医学院细胞中心;总 RNA 提取试剂盒(E.Z.N.A. Total RNA Kit I)购于美国 Omega 公司;RPMI-1640 购于美国 Gibco 公司;反转录试剂盒(Prime Script RT reagent Kit Perfect Real Time)购于日本 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 HBECs 的培养 用 10% 胎牛血清(FCS)的 RPMI-1640 培养基在 5% CO₂、37℃ 的恒温细胞培养箱中培养 HBECs。

1.2.2 实验分组及细胞增殖检测 通过噻唑蓝(MTT)法检测 LPS 对细胞增殖的影响。将生长良好的 HBECs 置于 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后弃原培养液,分为对照组和不同浓度 LPS 组(浓度分别设为 0.01、0.1、1.0、10 mg/L),各浓度设 4 个复孔。在培养终止前每孔加入 20 μL MTT 溶液再继续培养 4 h,然后弃去上清液,加入 150 μL 二甲基亚砜,放到摇床上待结晶完全溶解,通过酶标仪 570 nm 测定吸光度值(A 值)。相对生长指数(GI) = (处理组 A 值 / 对照组 A 值) × 100%, GI > 100% 为刺激生长, GI < 100% 为抑制生长。

1.2.3 FQ-PCR 测定 SPLUNC1 基因表达

1.2.3.1 分组及处理方法 将 HBECs 分为 LPS 组和对照组。LPS 组分别加入浓度为 0.01、0.1、1.0、10 mg/L 的 LPS,细胞培养箱中培养 2、4、8、16、24 h,再提取细胞总 RNA 用于 FQ-PCR 检测,以上同样实验重复 3 次。

1.2.3.2 细胞总 RNA 提取及 cDNA 的合成 严格按照试剂盒操作说明提取 RNA;电泳检测 RNA 的质量,并计算 RNA 含量,-20℃ 保存备用。

1.2.3.3 引物、探针 由上海生工生物工程有限公司设计和合成。

1.2.3.4 制备标准品 将反转录所得的 cDNA 进行半定量 PCR,由上海生工生物工程有限公司将 PCR 产物及扩增引物构建 SPLUNC1、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因质粒,提取 RNA 测 A 值,并得出基因拷贝数及其相应的浓度,得到质粒的实时荧光定量标准品。

1.2.3.5 FQ-PCR 反应 将反转录所得的 cDNA 模板稀释 10 倍,将模板、引物与 Mix 混合,PCR 反应体系和程序分别见表 1,获得 SPLUNC1 mRNA 及 GAPDH mRNA 的拷贝数。

表 1 FQ-PCR 反应体系及反应程序

反应体系	体积	反应程序	温度	时间	循环数
cDNA	2.0 μL	预变性	95℃	5 min	1
Mix	12.5 μL	定量 PCR	94℃	15 s	40
引物 F	1.0 μL		60℃	10 s	
引物 R	1.0 μL		72℃	15 s (收集荧光)	
ddH ₂ O	8.5 μL	HOLD	40℃	1 s	1

1.3 统计分析 本检测数据均采用 SPSS 13.0 软件软件进行统计分析,计量资料数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测不同浓度 LPS 刺激对 HBECs 增殖的影响 LPS 在一定浓度范围内(0.01 ~ 10 mg/L)能抑制细胞生长,存在剂量依赖性,细胞活力明显降低。见表 2。

表 2 不同浓度 LPS 对 HBECs 细胞增殖的影响

组别	孔数(孔)	A 值($\bar{x} \pm s$)	相对生长指数(%)
对照组	12	0.51 ± 0.02	100.00
LPS 0.01 mg/L 组	12	0.48 ± 0.03 ^a	94.12
LPS 0.1 mg/L 组	12	0.37 ± 0.01 ^{ab}	72.55
LPS 1.0 mg/L 组	12	0.30 ± 0.03 ^{ab}	58.82
LPS 10 mg/L 组	12	0.27 ± 0.02 ^{ab}	52.94

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与前一浓度组比较,^b $P < 0.01$

表 3 不同浓度 LPS 对 HBECs 细胞 SPLUNC1 基因相对表达量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数 (孔)	SPLUNC1 基因相对表达量				
		2 h	4 h	8 h	16 h	24 h
对照组	12	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.01
LPS 0.01 mg/L 组	12	0.19 ± 0.03 ^a	0.24 ± 0.04 ^{ac}	0.26 ± 0.03 ^{ac}	0.44 ± 0.05 ^{ac}	0.51 ± 0.07 ^{ac}
LPS 0.1 mg/L 组	12	0.43 ± 0.02 ^{ab}	0.52 ± 0.05 ^{abc}	0.60 ± 0.06 ^{abc}	0.63 ± 0.08 ^{abc}	0.68 ± 0.05 ^{abc}
LPS 1.0 mg/L 组	12	0.44 ± 0.02 ^a	0.48 ± 0.02 ^{abc}	0.50 ± 0.03 ^{abc}	0.58 ± 0.05 ^{abc}	0.70 ± 0.06 ^{abc}
LPS 10 mg/L 组	12	0.34 ± 0.03 ^{ab}	0.38 ± 0.04 ^{abc}	0.68 ± 0.05 ^{abc}	0.96 ± 0.08 ^{abc}	0.98 ± 0.07 ^{abc}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与前一浓度比较,^b $P < 0.01$;与前一时间点比较,^c $P < 0.01$

2.2 FQ-PCR 检测 SPLUNC1 基因表达

2.2.1 FQ-PCR 对不同时间点上 SPLUNC1 基因的表达情况检测结果结合标准曲线,我们可得到样品中 SPLUNC1 基因拷贝数(见图 1)及看家基因 GAPDH 基因拷贝数(见图 2),其中横坐标代表 Ct 值,纵坐标代表荧光强度。

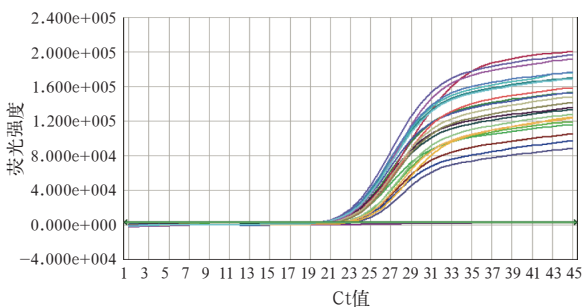


图 1 SPLUNC1 基因绝对定量结果扩增曲线

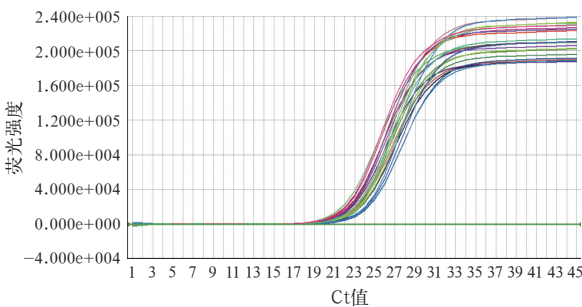


图 2 GAPDH 基因绝对定量结果扩增曲线

2.2.2 通过 SPLUNC1/GAPDH 基因拷贝数比值得到 LPS 诱导的 SPLUNC1 相对表达量,见表 3。LPS 诱导细胞 2 h 后 SPLUNC1 基因表达开始上调,同一浓度组随时间延长(2、4、8、16、24 h)基因表达量持续增高,在一定时间范围内呈时间依赖性。不同时间组间比较差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

3 讨论

SPLUNC1 蛋白可调节免疫应答和炎症反应,抑制病原菌的繁殖及呼吸道感染的发展,其作用机制目前不是很清楚。SPLUNC1 蛋白可通过增加细菌细胞壁的渗透性、诱导中性粒细胞的趋化、抑制生

物膜的形成达到杀菌或抑菌的作用。Sayeed 等^[5]研究发现,体内外环境中的 SPLUNC1 均有抑制铜绿假单胞菌生长的功能;Liu 等^[6]发现,SPLUNC1 蛋白能让小鼠抵抗肺炎克雷伯菌的能力增强。另外,肺炎链球菌感染^[7]、肺炎支原体感染^[8]也可以诱导 SPLUNC1 表达,从而发挥宿主防御作用。

本实验发现,与对照组比较,LPS 可抑制 HBECs 的生长,并能诱导 SPLUNC1 基因表达上调。在刺激 2 h 后发现基因表达开始上调,并在 24 h 内随着时间的延长持续增高,呈时间依赖性。推测可能随着时间的延长,细菌感染加重,SPLUNC1 蛋白的增加,机体抵抗细菌的能力也增强。在细菌及肺炎支原体感染后均可诱导支气管上皮细胞 SPLUNC1 基因表达,但在两者感染后基因表达量是否存在差异还有待进一步研究。

综上所述,SPLUNC1 蛋白能抵抗外界病原微生物的入侵,还能作为防御蛋白来保护宿主;同时可以增强慢性肺部疾病患者呼吸道对外界病毒、细菌的防御。这为以后 SPLUNC1 蛋白作为临床药物开发打下良好的基础。

参考文献

- 张瑾.住院儿童下呼吸道感染病原监测及耐药谱分析[D].石家庄:河北医科大学,2014.
- 邱卫强.我院 2011—2013 年细菌的菌群分布特点与耐药性分析[J].实用检验医师杂志,2014,6(1):21-26.
- 黄铭珊,金霆.探讨实时荧光定量 PCR 法检测血液新生隐球菌的临床意义[J].实用检验医师杂志,2015,7(1):28-31.
- 林瀛,陈小岩,俞训彬.结核分枝杆菌 DNA 实时定量 PCR 技术在临床病理诊断中的应用[J].实用检验医师杂志,2015,7(3):143-147.
- Sayeed S, Nistico L, St Croix C, et al. Multifunctional role of human SPLUNC1 in *Pseudomonas aeruginosa* infection[J]. Infect Immun, 2013, 81(1):285-291.
- Liu Y, Bartlett JA, Di ME, et al. SPLUNC1/BPIFA1 contributes to pulmonary host defense against *Klebsiella pneumoniae* respiratory infection[J]. Am J Pathol, 2013, 182(5):1519-1531.
- 尚燕萍,林立,李昌崇.肺炎链球菌诱导 SPLUNC1 表达及白藜芦醇对 SPLUNC1 表达的影响[J].中国当代儿科杂志,2017,19(1):111-116.
- 肖丁良,钟礼立,梁沫,等.肺炎支原体脂膜蛋白诱导人支气管上皮细胞 SPLUNC1 的表达[J].医学临床研究,2013,30(6):1041-1045.

(收稿日期:2017-05-17)
(本文编辑:杨程伍 李银平)