

白介素-22 诱导肺泡上皮 2 型人 β 防御素表达的初步研究

李阿敏, 崔学范, 黄 茂

(南京医科大学第一附属医院呼吸内科, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**初步探讨对于直接或间接引起的肺内感染,炎症反应产生的白介素(IL)-22 能否刺激肺泡 II 型上皮细胞,并且诱导其生成、释放 2 型人 β 防御素(human β -defensin-2, HBD-2)发挥抗感染作用。**方法:**流式细胞术检测肺泡 II 型上皮细胞细胞膜表面 IL-22R 表达水平。重组人 IL-22(20 ng/ml)刺激肺泡 II 型上皮细胞,RT-PCR 检测不同时间(0、2、4、8、16、24 h)HBD-2 表达情况。不同浓度的重组人 IL-22(0、4、20、100、500 ng/ml)刺激肺泡 II 型上皮细胞,RT-PCR 检测 HBD-2 表达情况。**结果:**肺泡 II 型上皮细胞膜表面 IL-22R 表达呈强阳性,阳性率达(99.90 \pm 0.13)%。比较 6 个时间点 HBD-2 表达差异,发现 HBD-2 表达具有时间依赖性。比较不同浓度 IL-22 处理下 HBD-2 表达差异,IL-22 100 ng/ml 为最佳干预浓度,且 HBD-2 表达与 IL-22 浓度具有依赖关系。**结论:**IL-22 能显著诱导肺泡上皮细胞生成并释放 HBD-2,且具有时间和剂量依赖性。

[关键词] 白介素-22; 2 型人 β 防御素; 肺泡上皮细胞

[中图分类号] R563.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)02-199-05

Investigation of regulation of IL-22 on human β -defensin-2 expression in human alveolar epithelium

LI A-min, CUI Xue-fan, HUANG Mao

(Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate whether human alveolar type II epithelial cells express IL-22R and whether it generates human β -defensin-2 (HBD-2) under the stimulation with IL-22. **Methods:** First, flow cytometry (FCM) detected the expression of IL-22R on alveolar type II epithelial cells; second, cells were stimulated with recombinant human IL-22 (rhIL-22) for 0, 2, 4, 8, 16, 24 hours, separately, and then RT-PCR tested the expression of HBD-2; third, the cells were stimulated with different concentration (0, 4, 20, 100, 500 ng/ml) of IL-22 for optimal dose. **Results:** The membranes of alveolar type II epithelial cells highly expressed IL-22R and the positive rate is (99.90 \pm 0.13)%; 24 hours is an effective time for HBD-2 expression with IL-22 treatment, and the optimal concentration is 100 ng/ml. **Conclusion:** The alveolar type II epithelial cells highly express IL-22R, and the interaction of IL-22 and IL-22R induces the HBD-2 gene expression in alveolar epithelium in a time- and concentration-dependent manner.

[Key words] interleukin-22; human β -defensin-2(HBD-2); alveolar epithelial cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(2): 199-203]

白介素(IL)-22 属于 IL-10 家族,最早被定义为 IL-10 相关的 T 细胞来源的可诱导因子(IL-TIF),由 Dumoutier 等^[1]用 IL-9 刺激鼠 T 淋巴细胞生成,其 22%的氨基酸序列与 IL-10 相同。该因子作用于消化、皮肤和呼吸等系统,在调节黏膜免疫方面发挥重要作用。大量研究结果表明,多种病原体导致的肺部感染都会引起 IL-22 表达增加。

近年发现,新定义的 CD4⁺ T 细胞的亚型 Th17 细胞是产生 IL-22 的主要来源。在肺部感染,特别是急性感染过程中,当病原体侵入机体,抗原提呈细

胞主要是树突状细胞和巨噬细胞处理递呈抗原的同时产生 IL-23,IL-23 继而活化 Th17 细胞,由后者产生包括 IL-22 在内的多种细胞因子发挥抗感染作用,即 IL-23/IL-17 轴效应^[2]。IL-22 是此轴的一种重要分子,它可以作用于支气管上皮细胞相应受体,调节下游效应因子生成,如趋化因子 CXCL2 型人 β 防御素(human β -defensin-2, HBD-2),前者招募中性粒细胞至感染病灶,后者发挥重要的抑菌杀菌作用^[3]。

防御素是一类分子结构高度保守且具有广谱

抗微生物作用的小分子阳性肽,它可以产生于细菌、昆虫、植物以及脊椎动物。HBD-2 是其中的一个亚型,主要来源于各种器官组织的上皮细胞,属于诱导表达。目前认为其杀菌机制是通过自身所带的正电荷与细菌细胞膜表面磷脂所带负电荷结合,破坏细菌细胞膜完整性从而使细菌裂解。除此之外,在机体免疫调节方面,防御素对多种细胞如单核细胞、T 淋巴细胞和树突状细胞具有化学趋化特性^[4]。由此,防御素将固有免疫和适应性免疫紧密联系起来,其抗感染作用越来越受到人们的重视。

有研究证明 IL-22 能刺激支气管上皮产生 HBD-2,这在局部抵抗病原体意义重大。然而,对于病原体导致的肺内感染,炎症反应产生的 IL-22 是否也能诱导肺泡 II 型上皮细胞生成 HBD-2 从而发挥抗感染作用,这个问题尚待研究。

1 材料与方法

1.1 材料

重组人 IL-22 (rhIL-22, R&D Systems 公司, 美国); 肺泡 II 型上皮细胞系 A549 (南京医科大学第一附属医院肿瘤科实验室惠赠); 单克隆抗人 IL-22R-APC、鼠 IgG₁ 同源对照抗体-APC (R&D Systems 公司, 美国); TRIzol Reagent (Invitrogen 公司, 美国); Prime Script RT reagent Kit、HBD-2 引物、GAPDH 引物 (大连宝生物工程有限公司); 2×Taq PCR MasterMix (南京博尔迪生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏、培养和传代

人肺泡 II 型上皮细胞系 A549 呈贴壁生长, 培养于含 10% 胎牛血清、10⁵ U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养液中, 置于含 5% CO₂ 的 37℃ 细胞培养箱中。2~3 d 换液 1 次, 长至培养瓶底面 90% 时用 0.25% 胰酶消化传代 1 次。如此, 细胞培养 3 代以后, 进行相应的实验操作。

1.2.2 流式细胞仪检测 A549 细胞膜表面 IL-22R

将正常贴壁生长的 A549 细胞用 0.25% 胰酶消化, 1 000 r/min 离心 4 min, 弃上清, PBS 溶液洗涤细胞 2 次, 然后加新鲜培养基重悬, 置 37℃ 摇床上继续培养 6~10 h, 在细胞不贴壁情况下使膜表面受体再生。然后将细胞离心 (1 000 r/min, 4 min), D-PBS 重悬至细胞密度为 4 × 10⁶ 个/ml, 取 25 μl (1 × 10⁵ 个细胞) 于 5 ml EP 管中, 加 10 μl 抗人 IL-22R-APC 单克隆抗体, 4℃ 避光孵育 40 min。最后, 将细胞离心 (1 000 r/min, 4 min), 弃上清, 去除未结

合的荧光抗体, D-PBS 重悬细胞至 300 μl。将同源对照抗体以同样的方法标记细胞。美国 BD 公司 FACS Aria 流式细胞仪 FACSDiva 软件分析染色结果, 首先界定同源对照抗体阳性免疫染色的背景情况, 再将标记好的细胞悬液设门, 筛选出 IL-22R⁺ 细胞, 即得 IL-22R⁺ 细胞占细胞总数的百分比。

1.2.3 rhIL-22 刺激 A549 细胞后不同时间点抽提 RNA

将 A549 细胞传代至 6 个 60 mm × 15 mm 规格的培养皿中继续培养, 待细胞生长达一定密度时, 准备 rhIL-22 干预。干预前基础培养基饥饿培养细胞过夜, 次日上午于各培养皿中分别加入 20 ng/ml rhIL-22, 6 个处理组分别于 0、2、4、8、16、24 h 后采用 TRIzol 试剂抽提 RNA, -80℃ 保存。

1.2.4 RT-PCR 法测定各时间组 HBD-2 mRNA 表达差异

将各时间组总 RNA 逆转录为 cDNA, 以此为模板行 PCR 扩增。取逆转录产物 1 μl 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μl, 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 50 s, 进行 33 个循环, 最后延伸 7 min。将 PCR 产物在 2% 的含溴化乙锭的琼脂糖凝胶中进行电泳, Band Leader 3.0 软件比较各组 HBD-2 与 GAPDH 的相对光密度值并进行半定量分析, 确定最佳干预时间。HBD-2 上游引物: 5'-CCAGCCATCAGCCATGAGGGT-3', HBD-2 下游引物: 5'-GGAGC-CCTTCTGAATCCGCA-3'; GAPDH 上游引物: 5'-CGGAGTCAACGGATTTGCTCGTAT-3'; GAPDH 下游引物: 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'。

1.2.5 比较不同浓度的 rhIL-22 刺激 A549 细胞最佳时间 HBD-2 表达差异

将 A549 细胞传代至 5 个 60 mm × 15 mm 规格的培养皿中继续培养, 待细胞生长达一定密度时, 准备 rhIL-22 干预。干预前基础培养基饥饿培养细胞过夜, 次日 5 个处理组分别给予 0、4、20、100、500 ng/ml 的 rhIL-22, 干预最佳时间后抽提 RNA, 方法同前。RT-PCR 反应体系、反应条件及 HBD-2 mRNA 表达分析同 1.2.4 节。

1.3 统计学方法

所得定量资料描述为均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$), SPSS11.5 统计软件进行方差分析。各组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Scheffe 法 (方差齐时)、Tamhane's T2 法 (方差不齐时), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测 A549 细胞膜表面 IL-22R

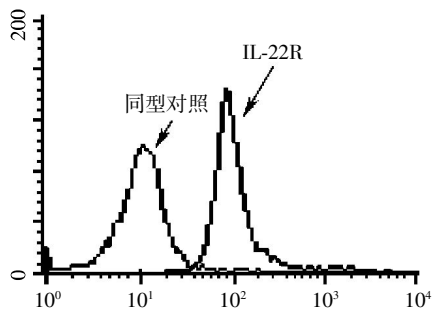
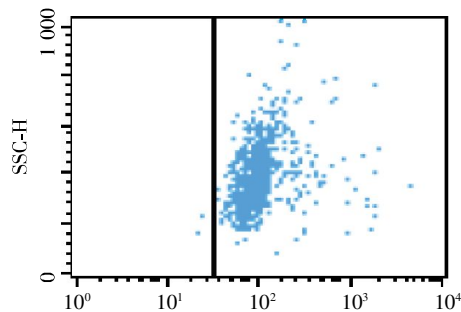


图 1 肺泡 II 型上皮细胞系 A549 细胞膜表面 IL-22R 测定(流式细胞仪)

Figure 1 The quantity of IL-22R⁺ on alveolar epithelial cell II lines A549 measured by flow cytometry

肺泡 II 型上皮细胞系 A549 细胞膜表面 IL-22R 表达呈强阳性,与同源对照组相比,其阳性率达 $(99.90 \pm 0.13)\%$ ($P < 0.05$,图 1),实验结果重复 3 次。



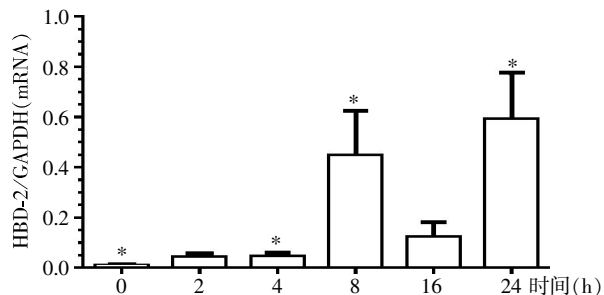
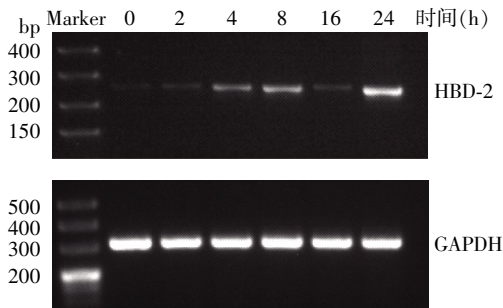
2.2 RT-PCR 检测各时间组 HBD-2

rhIL-22 刺激 A549 细胞的 6 个时间组(0、2、4、8、16、24 h) 均有 HBD-2 表达,比较得到 24 h 组 HBD-2 mRNA 的相对表达量 (0.5915 ± 0.1858) 最高,并且 0、4、8、24 h 组之间两两比较,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05, n = 3$),由此得出 IL-22 诱导 HBD-2 表达呈一定的时间依赖关系(图 2)。

2.3 RT-PCR 检测各浓度组 HBD-2

5 个浓度梯度(0、4、20、100、500 ng/ml)的 rhIL-22 刺激 A549 细胞均有 HBD-2 表达,且各组间具有

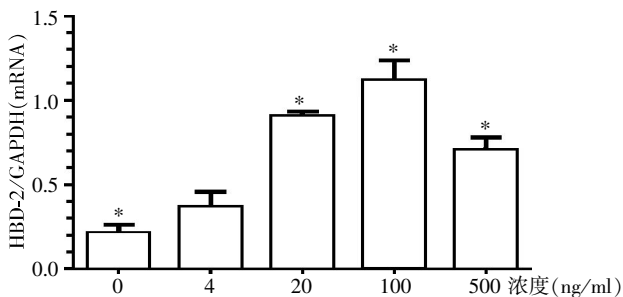
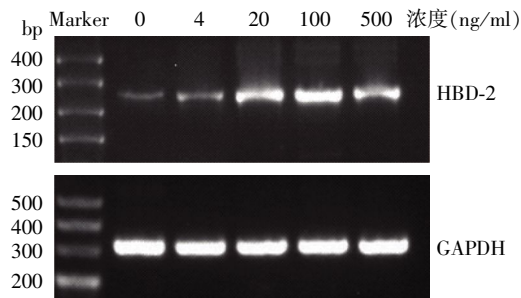
浓度依赖关系。其中 100 ng/ml 组 HBD-2 mRNA 的相对表达量 (1.118 ± 0.120) 最高,为最佳干预浓度。0、20、100、500 ng/ml 组间两两比较,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05, n = 3$,图 3)。



*:组间两两比较差异均有统计学意义, $P < 0.05, n = 3$ 。

图 2 RT-PCR 检测 rhIL-22 刺激 A549 细胞不同时间组 HBD-2 表达

Figure 2 RT-PCR analyzes the quantity of HBD-2 expression from A549 cells after rhIL-22 (20 ng/ml) stimulating for different time



*:组间两两比较差异均有统计学意义, $P < 0.05, n = 3$ 。

图 3 RT-PCR 检测不同浓度 rhIL-22 刺激 A549 细胞 HBD-2 表达

Figure 3 RT-PCR was performed for HBD-2 and GAPDH detection in A549 cells after rhIL-22 stimulating for 24 h with various concentrations

3 讨论

肺泡上皮包括 I 型和 II 型两种上皮细胞,前者是结构细胞起支架作用支撑肺泡,后者是功能细胞具有分泌功能。当病原体侵入肺泡引起肺内感染时,肺泡上皮便成为抵御病原体的第一道防线,而

肺泡 II 型上皮细胞在炎症刺激下分泌的多种细胞因子也在很大程度上限制了病原体的进一步入侵。然而,肺内感染的发病率仍呈逐年上升趋势,各种病原体的耐药率越来越高,耐药机制也越来越多样化^[5]。而抗生素治疗肺内感染的现状并不乐观,这就需要探索新方法和新途径避免细菌耐药性。

防御素是一种抗微生物肽,后者是一类分子结构高度保守且具有广谱抗微生物活性的小分子阳性肽。在哺乳动物体内,抗微生物肽能够保护宿主抵抗细菌、病毒、真菌以及某些寄生虫的感染。近来发现该类肽除具有直接抗微生物活性外,尚有中和内毒素、趋化因子样活性、免疫调节特性以及诱导血管生成和修复伤口的功能^[6-7]。在人类,防御素是最重要的一种抗微生物肽,根据分子结构不同主要分为 α 和 β 两大类,每一类又包括不同的亚型。 α 防御素(HNP-1、2、3、4)主要来源于中性粒细胞,为组成性表达, β 防御素(HBD-1、2、3、4)则可以产生于各种组织器官的上皮细胞,如肺上皮、肠上皮、尿道上皮、皮肤上皮等,其中 HBD-2(最重要的抗感染亚型)属于诱导表达,诱导因子主要有 IL-1 α 、IL-1 β 、G⁺菌、G⁻菌、肿瘤坏死因子(TNF)、脂多糖(LPS)^[8]。

IL-22 主要来源于激活的 Th17 细胞,是 IL-23/IL-17 轴的重要因子。肺内炎症反应产生的 IL-22 并不能直接杀伤或清除病原体,其抗感染机制有赖于下游效应分子的生成。有研究发现 IL-22 能够诱导支气管上皮细胞产生 HBD-2、G-CSF、IL-6、钙结合蛋白 S100A7、S100A12 等一系列细胞因子。并且,人为阻断 IL-22 后,感染模型组的细菌会很快在肺内扩散,这说明 IL-22 的存在,很大程度上限制了肺内病原体的蔓延^[3]。

本研究得出了两个重要结论,即人肺泡 II 型上皮细胞膜表面高度表达 IL-22R;IL-22 能够刺激人肺泡 II 型上皮细胞 HBD-2 基因表达。有研究表明,IL-22 和另外 21 种细胞因子如 IL-17、IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 都是刺激支气管上皮细胞 HBD-2 表达的有效因子。本研究首次发现,对于肺泡上皮,IL-22 同样可以诱导 HBD-2 基因高度表达。

在病原体感染过的支气管腔和肺泡腔,IL-22 的分泌量均显著增加,它扮演的抗感染角色主要表现在诱导下游多种细胞因子的生成,其中 HBD-2 的抗微生物活性以及对未成熟树突状细胞和记忆性 T 细胞的趋化性对病原体清除尤为重要。有研究发现,将小鼠体内的 IL-22 中和处理后,其抵御病原体的能力大大削弱^[3]。因此,IL-22 促进支气管上皮和

肺泡上皮 HBD-2 生成这一事实表明,IL-22 从固有免疫应答到适应性免疫应答直接或间接诱导肺内炎症反应从而发挥抗感染作用。

本实验结果显示,IL-22 刺激人肺泡 II 型上皮细胞生成 HBD-2 具有时间和剂量依赖关系。并且,低浓度的 IL-22(4 ng/ml)就能有效诱导 HBD-2 表达。近年来,很多研究都已证实支原体、衣原体、链球菌、克雷伯杆菌、结核杆菌以及绿脓杆菌等病原体引起的肺部感染都能引起 IL-23 的产生,Th17 细胞的激活以及 IL-22 等细胞因子的释放,且在人为阻断此效应轴中任一环节的情况下,实验组体内病原体数量明显高于对照组,同时体外实验也表明 IL-22 具有很强的抑菌效果,即 IL-23/IL-17 效应轴参与了机体防御多种病原体导致的肺部感染^[9-12]。根据以上事实推测,在肺内感染早期,病原体产物如 LPS 结合肺泡上皮非特异性受体 TLR-4,只能生成少量的 HBD-2。依靠这些微量的 HBD-2 所介导的抗微生物活性和免疫趋化特性,对于防御肺内病原体的扩散来说,作用非常有限。然而,当激活的 Th17 细胞游走至感染病灶,释放 IL-22,随后 IL-22 结合肺泡上皮细胞膜表面 IL-22R,通过一定的信号通路调节 HBD-2 的大量释放,从而发挥重要的抗感染活性。本研究认为,IL-22 诱导肺泡上皮 HBD-2 基因高表达对于肺内抵御病原体将发挥重要作用,下一步我们将从信号通路途径和蛋白水平更深层次探讨这一通路的相关机制,为临床治疗肺内感染提供新的理论依据。

[参考文献]

[1] Dumoutier L,Louahed J,Renaud JC. Cloning and characterization of IL-10-related T cell derived inducible factor (IL-TIF),a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9 [J]. J Immunol,2000,164(4):1814-1819

[2] Wu Q,Martin RJ,Rino JG,et al. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory Mycoplasma pneumoniae infection [J]. Microbes Infect, 2007,9(1):78-86

[3] Aujla SJ,Chan YR,Zheng M,et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia[J]. Nat Med,2008,14(3):275-281

[4] Lai Y,Gallo RL. AMPed up immunity:how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense [J]. Trends Immunol,2009,30(3):131-141

[5] 何 玉. 897 例老年肺部感染病原菌及耐药性分析[J].

- 南京医科大学学报(自然科学版),2009,29(6):904-905
- [6] Yang D, Biragyn A, Kwak LW, et al. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal [J]. Trends Immunol, 2002, 23 (6): 291-296
- [7] Zaiou M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases [J]. J Mol Med, 2007, 85 (4): 317-329
- [8] Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, et al. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease [J]. Clin Immunol, 2010, 135(1): 1-11
- [9] Zhou X, Chen Q, Moore J, et al. Critical role of the interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in regulating host susceptibility to respiratory infection with Chlamydia species [J]. Infect Immun, 2009, 77(11): 5059-5070
- [10] Khader SA, Bell GK, Pearl JE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge [J]. Nat Immunol, 2007, 8(4): 369-377
- [11] Dubin PJ, Kolls JK. IL-23 mediates inflammatory responses to mucoid Pseudomonas aeruginosa lung infection in mice [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 292(2): L519-L528
- [12] Ma J, Wang J, Wan J, et al. Morphine disrupts interleukin-23 (IL-23)/IL-17-mediated pulmonary mucosal host defense against Streptococcus pneumoniae infection [J]. Infect Immun, 2010, 78(2): 830-837
- [收稿日期] 2011-05-31

《南京医科大学学报(社会科学版)》简介

《南京医科大学学报(社会科学版)》于 2000 年底创刊,2011 年改版为双月刊,是江苏省教育厅主管,南京医科大学主办的社科类期刊。十年来一直秉承为我国医疗卫生事业服务的办刊宗旨,为卫生事业改革、医院管理、医学法学、生命伦理学、医学教育等领域提供学术交流的平台。《南京医科大学学报(社会科学版)》为《中国核心期刊(遴选)数据库》全文收录期刊、《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊、《万方数据库——数字化期刊群》入编期刊,连续两届荣获全国理工农医院校优秀社科学报,2011 年更荣获全国理工农医院校优秀编辑团队的称号。2012 年全新推出,欢迎投稿,欢迎订阅!

地 址: 江苏省南京市汉中路 140 号 2 号楼 352 室
电 话: 025-86862036, 86862862
邮 箱: nyxb_sh@njmu.edu.cn
网 址: <http://jnmun.jnmun.edu.cn/aumn/ch/index.aspx>