

# 人支气管上皮细胞表达的斯钙素-1在上皮间充质转化中的作用研究

许家艳,孟亚奇,贾 嫄,姚 欣\*

南京医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科,江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:明确斯钙素-1(stanniocalcin-1,STC1)对支气管上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)的影响,以及香烟烟雾提取物(cigarette smoke extract,CSE)对支气管上皮细胞STC1表达调控的效应,探讨STC1在慢性阻塞性肺疾病气道EMT中的可能作用。方法:采用转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ ,TGF- $\beta$ )处理人支气管上皮(16HBE)细胞72 h诱导EMT模型;外源加入STC1重组蛋白(rhSTC1),Western blot及免疫荧光法检测EMT标志物E-钙黏蛋白(E-cadherin)和 $\alpha$ -平滑肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达。采用CSE刺激16HBE细胞24 h;实时定量PCR及Western blot检测STC1 mRNA和蛋白表达差异,外源加入NF- $\kappa$ B抑制剂JSH23,Western blot检测STC1表达差异。结果:TGF- $\beta$ 可诱导16HBE细胞由典型的多边铺路石样变为长梭形,上皮细胞标志物E-cadherin表达下降,间质细胞标志物 $\alpha$ -SMA表达增加,rhSTC1可逆转上述改变。CSE可刺激16HBE细胞STC1表达增高,且呈浓度依赖性增加,外源加入NF- $\kappa$ B抑制剂JSH23可抑制上述效应。结论:STC1在慢性阻塞性肺疾病形成过程中,是抑制气道EMT的保护性因素。CSE局部刺激支气管上皮细胞,通过NF- $\kappa$ B信号导致STC1反应性增加可能是其主要来源之一。

**[关键词]** 斯钙素-1;人支气管上皮细胞;上皮间充质转化;慢性阻塞性肺疾病

**[中图分类号]** R563

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)09-1198-06

doi:10.7655/NYDXBNS20180905

## The effect of stanniocalcin-1 on epithelial-mesenchymal transition in bronchial epithelial cells

Xu Jiayan, Meng Yaqi, Jia Man, Yao Xin\*

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of stanniocalcin (STC1) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and the expression in bronchial epithelial cells. **Methods:** Western blot and immunofluorescence were used to examine EMT associated biomarkers including E-cadherin and alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). The STC1 mRNA and protein levels stimulated by cigarette smoke extract (CSE) in human bronchial epithelial (16HBE) cells were analyzed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. **Results:** TGF- $\beta$  induced EMT of 16HBE cells where the cell morphology changed from a typical multilateral paving stone-like appearance to a mesenchymal-like fusiform appearance along with the decreased expression of epithelium biomarker E-cadherin and the increased expression of mesenchymal cell markers  $\alpha$ -SMA. rhSTC1 significantly inhibited the EMT changes mentioned above. The expression of STC1 was increased by CSE in a concentration-dependent manner in 16HBE cells. And this effect was inhibited by NF- $\kappa$ B inhibitor JSH23. **Conclusion:** STC1 was a protective factor to inhibit EMT during the development of COPD. CSE may stimulate bronchial epithelial cells, and increase the expression of STC1 through NF- $\kappa$ B signal, which may be the main source.

**[Key words]** STC1; human bronchial epithelial cells; EMT; COPD

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(09): 1198-1203]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81470237)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: yaoxin@njmu.edu.cn

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种常见的以持续气流受限为特征的疾病,这种不可逆的气流受限目前认为与

气道重塑密切相关<sup>[1]</sup>,外界因素反复损伤、修复导致支气管上皮结构及功能受损是促使气道重塑形成的主要原因<sup>[2]</sup>。研究表明,上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),即上皮细胞在损伤因素刺激下,失去其原有的尖端-基底极性,获得间质细胞特征,转化成为气道成纤维细胞<sup>[3]</sup>,是气道重塑的重要启动环节<sup>[4]</sup>。近年来,陆续有研究表明,EMT的发生发展与多种信号通路及细胞因子有关,特别是钙离子信号与其密切相关<sup>[5]</sup>。现已明确,钙离子信号在COPD、哮喘等慢性气道疾病中能够被激活<sup>[6-7]</sup>,并与气道上皮受损有关,而阻断钙离子内流则可抑制EMT发生<sup>[8]</sup>。

斯钙素-1(stanniocalcin-1, STC1)是一种新近发现的能够抑制钙离子内流的分泌型糖蛋白<sup>[9]</sup>,研究表明,STC1可表达于肺支气管上皮细胞<sup>[10]</sup>;Ono等<sup>[11]</sup>研究发现,特发性肺纤维化动物模型中,STC1能够体现出抗肺纤维化作用。上述研究进一步提示支气管上皮细胞STC1可能通过抑制钙离子内流抑制EMT,在COPD的EMT形成过程中发挥保护作用。

本研究拟通过体外研究,进一步明确STC1对支气管上皮细胞EMT过程的影响,以及香烟提取物(cigarette smoke extract, CSE)对支气管上皮细胞STC1表达调控的效应,探讨STC1在COPD气道EMT机制中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人支气管上皮细胞系(16HBE,北京肿瘤研究所)。胎牛血清(FBS, Sciencell公司,美国)。STC1抗体(Genetex公司,美国), $\alpha$ -平滑肌动蛋白( $\alpha$ -SMA, Abcam公司,英国),上皮钙黏着蛋白(E-cadherin)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(Cell Signaling Technology公司,美国)。转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )(Peprotech公司,美国)。人重组STC1蛋白(rhSTC1, Biovendor公司,捷克)。NF- $\kappa$ B抑制剂JSH23(上海 Calbiochem公司)。PrimeScript™ 逆转录试剂盒和 Super Real qPCR PreMix(SYBR Green, Takara公司,日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

16HBE细胞株用RPMI-1640培养基、10%胎牛血清、1%双抗配置完全培养基置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

#### 1.2.2 Real-time PCR

用不同浓度CSE(1.0、2.5、5.0%)处理细胞24 h,以不加任何干预措施的细胞为对照组。移去培养基,预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞后,每孔加入1 mL TRIzol 提取细胞总RNA,逆转录后加入SYBR Green 行RT-PCR。引物序列:STC1,上游5'-GTGGCGGCTCAAACTCAG-3',下游5'-GTGGAGCACCTCCGAATGG-3'; GAPDH,上游5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3',下游5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。反应条件为:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火30 s,72℃延伸10 min,共40个循环。最后以GAPDH为内参,计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ,比较目的基因的相对表达量。

#### 1.2.3 Western blot

细胞蛋白提取:取出细胞培养6孔板,吸掉培养基,用PBS洗1遍,每孔加60  $\mu$ L含PMSF的RIPA裂解液,于冰上静置30 min,用干净刮棒将细胞刮下,移至1.5 mL离心管中,整个操作尽量在冰上进行。12 000 r/min 4℃离心20 min。吸取上清至新离心管中,以BCA法检测蛋白浓度,加入1/4体积的5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,吹打均匀,沸水煮5~10 min,使蛋白充分变性。短时间室温摆放后置-20℃冰箱保存,避免反复冻融。Western blot 分别配置10%聚丙烯酰胺分离胶、5%聚丙烯酰胺浓缩胶、电泳液、转膜液、5%脱脂牛奶及TBST备用,各孔加上样蛋白20  $\mu$ g,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜上;再将PVDF膜放入脱脂牛奶中37℃封闭1 h,加入一抗(STC1抗体1:2 000、GAPDH抗体1:5 000、E-cadherin抗体1:1 000、 $\alpha$ -SMA抗体1:1 000)于4℃孵育过夜;TBST洗涤后加入生物素标记的二抗(山羊抗兔1:5 000),37℃孵育1 h, TBST洗3遍,每次10 min,最后以ECL超敏发光液检测阳性信号,并以GAPDH蛋白表达水平作为内参。

#### 1.2.4 细胞免疫荧光

24孔板中分别加入100 ng/mL rhSTC1、10 ng/mL TGF- $\beta$ 处理16HBE 72 h,以不加干预措施的16HBE为对照组。先用4%的多聚甲醛固定细胞,0.2% Triton X-100破膜,10%的山羊血清封闭。接着用10%山羊血清稀释E-cadherin一抗(1:100),每孔加入100  $\mu$ L后放入4℃冰箱过夜。第2天摇床孵育异硫氰酸荧光素标记的荧光二抗(1:200),4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染核后于荧光显微镜

下观察拍照。

### 1.3 统计学方法

采用 Graphpad Prism 6.0 软件, 计量资料以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 采用 Graphpad 统计软件进行数据分析, 两组间差异分析采用成组 *t* 检验, 多组间差异分析采用单因素方差分析结合最小显著差法进行。  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 rhSTC1 抑制 TGF-β 诱导的 16HBE 发生 EMT

TGF-β 处理 16HBE 细胞 72 h 可诱导细胞由典型的多边铺路石样变为长梭形, 呈间质细胞样改变, 加入外源 rhSTC1, 细胞形态发生逆转(图 1)。Western blot 结果显示 TGF-β 诱导上皮细胞标志物 E-cadherin 表达下降, 间质细胞标志物 α-SMA 表达增加, 外源加入 rhSTC1 可逆转上述改变( $P < 0.05$ , 图 2)。免疫荧光显示相同结果(图 3)。

### 2.2 CSE 促进 16HBE 细胞 STC1 表达

CSE(1.0、2.5、5.0%) 刺激 16HBE 细胞 24 h 可明显上调 STC1 mRNA 表达( $P < 0.05$ , 图 4), 蛋白也可

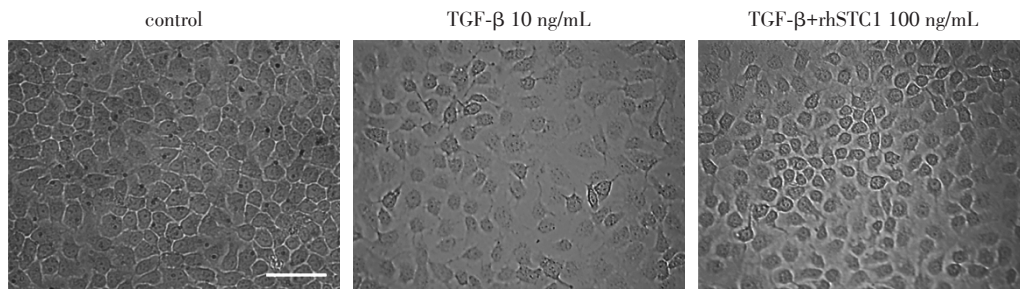
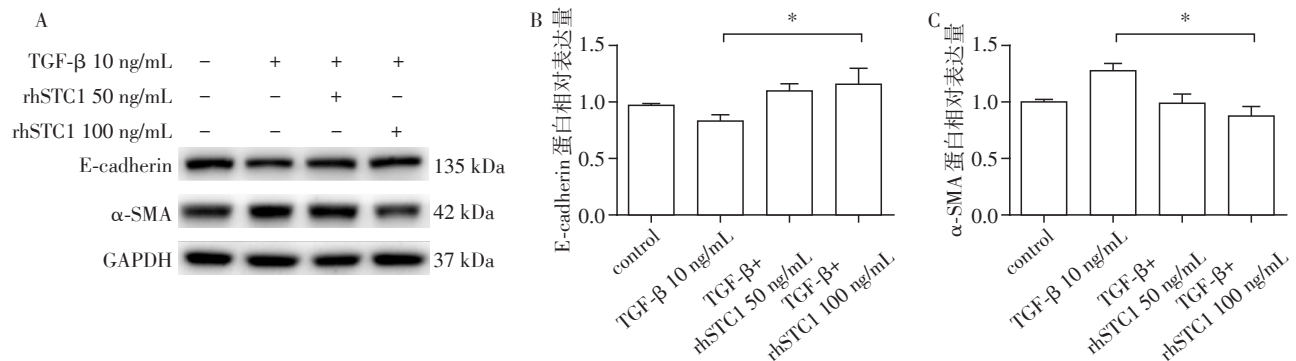


图 1 体外培养细胞倒置显微镜像(×200)

Figure 1 Cultured cells *in vitro* observed by inverted microscope image(×200)



A: Western blot 检测结果; B: E-cadherin 蛋白相对表达量; C: α-SMA 蛋白相对表达量。与 TGF-β 10 ng/mL 组相比, \* $P < 0.05$  ( $n=3$ )。

图 2 加入不同浓度外源 rhSTC1 对 16HBE 细胞 E-cadherin 和 α-SMA 蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of rhSTC1 on E-cadherin and α-SMA protein expressions in 16HBE cells

见相同改变( $P < 0.05$ , 图 5)。

### 2.3 CSE 通过 NF-κB 信号通路上调 STC1 表达

NF-κB 抑制剂 JSH23 20 μmol/L 处理 16HBE 细胞 24 h, 导致 50% CSE 诱导上调的 STC1 表达被抑制( $P < 0.05$ , 图 6)。

## 3 讨论

本研究表明, STC1 能够明显逆转 TGF-β 诱导的 16HBE 细胞 EMT 过程; CSE 可通过 NF-κB 通路促进 16HBE 细胞 STC1 表达。上述结果高度提示了在 COPD 形成过程中, STC1 是抑制气道 EMT 的保护性

因素, CSE 对支气管上皮细胞局部刺激导致其 STC1 反应性表达增加可能是其主要来源。

EMT 即上皮失去其原有的紧密连接, 尖端-基底极性以及黏附能力, 获得间质细胞迁移能力及产生细胞外基质成分, 参与多种纤维化疾病的发生发展<sup>[4]</sup>。EMT 过程中上皮细胞的间质细胞标志物 α-SMA/vimentin 表达增加, 上皮性标志物 E-cadherin 表达下降。近年来通过小气道活检结果进一步证实 COPD 患者小气道存在 EMT 现象, 包括肺组织小气道上皮 E-cadherin 表达明显下降, vimentin 表达明显升高, 同时在增厚的网状基底膜发现存在 vimentin 阳性的



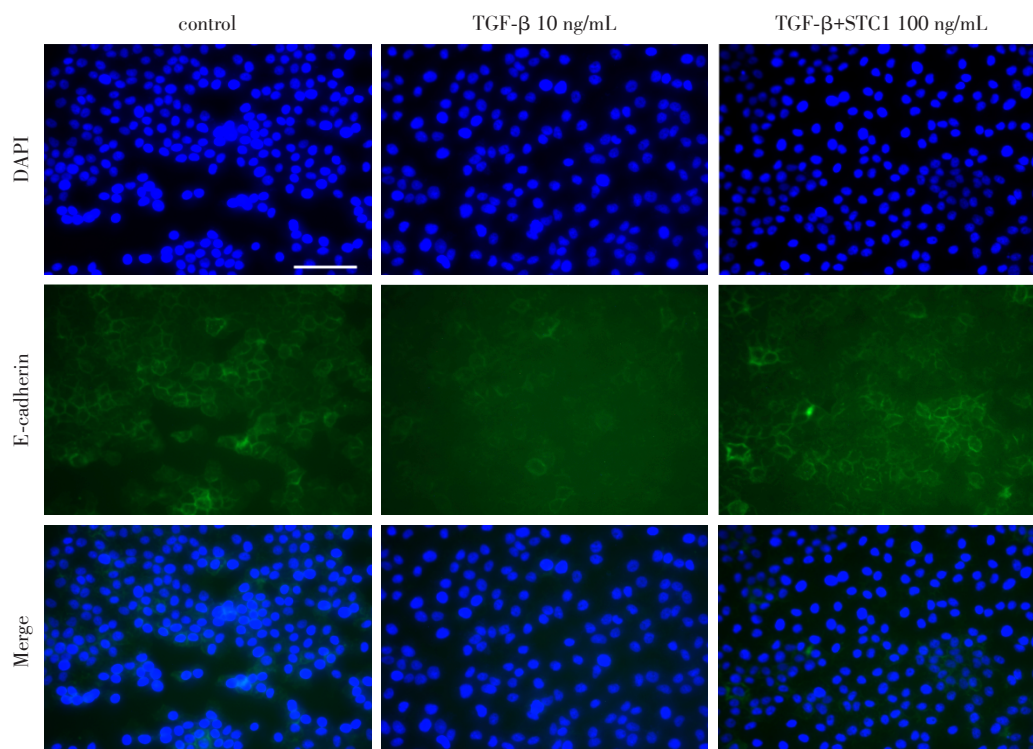
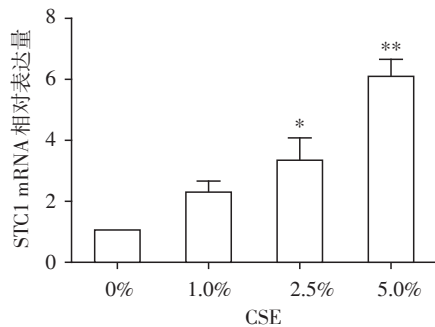


图3 E-cadherin表达的细胞免疫荧光像(×200)

Figure 3 Expression of E-cadherin observed by immunofluorescence(×200)

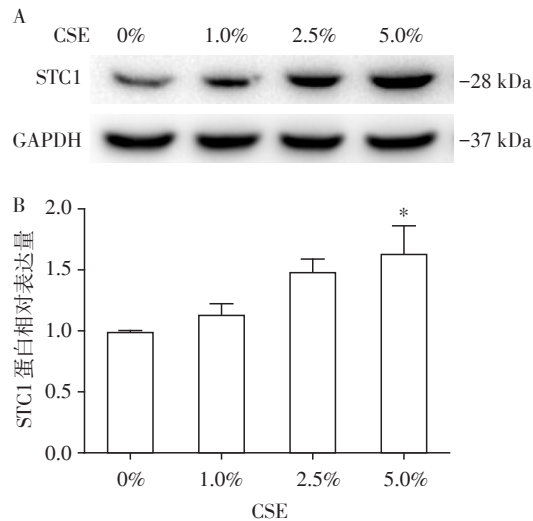


与0% CSE相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ )。

图4 Real-time PCR检测不同浓度CSE对16HBE细胞STC1 mRNA水平的影响

Figure 4 Detection of different concentrations of CSE on the level of STC1 mRNA in 16HBE by real-time PCR

细胞<sup>[12]</sup>。但目前COPD形成过程中EMT机制尚不明确,香烟作为COPD最主要的刺激因素,研究表明香烟可诱导EMT发生,且主要通过上调TGF- $\beta$ ,因为吸烟者及COPD患者肺组织TGF- $\beta$ 表达明显升高,且TGF- $\beta$ 表达水平与吸烟程度及小气道阻塞程度呈显著正相关<sup>[13]</sup>;进一步将COPD患者气道上皮行体外气液界面培养,抑制TGF- $\beta$ 表达可明显逆转COPD患者气道EMT改变<sup>[12]</sup>,相同结果在香烟诱导的支气管上皮细胞EMT模型中得以显现<sup>[14]</sup>;同时



A: Western blot检测结果; B: STC1蛋白相对表达量。与CSE(0%)组相比, \* $P < 0.05$  ( $n=3$ )。

图5 Western blot检测不同浓度CSE对16HBE细胞STC1蛋白表达的影响

Figure 5 Detection of CSE with different concentrations on the level of STC1 protein in 16HBE cells by Western blot

TGF- $\beta$ 作为促纤维化因子,一般被认为是诱导气道上皮发生EMT的最主要因子<sup>[12]</sup>,因此本研究拟采用TGF- $\beta$ 诱导16HBE细胞EMT模型来初步探讨STC1



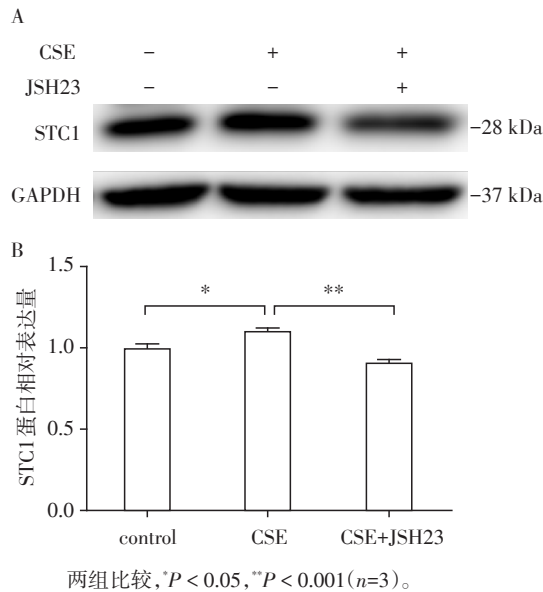


图6 Western blot检测NF- $\kappa$ B通路抑制剂JSH23 (20  $\mu$ mol/L)对CSE(5%)诱导STC1表达的作用  
Figure 6 Detection of NF- $\kappa$ B pathway inhibitor JSH23 (20  $\mu$ mol/L) on the expression of STC1 induced by CSE (5%) via Western blot

在COPD气道EMT中的可能作用。结果显示该模型中,上皮细胞形态由典型的多边铺路石样变为长梭形的间质细胞样改变,分子学显示上皮细胞标志物E-cadherin表达下降,间质细胞标志物 $\alpha$ -SMA表达增加。本研究结果进一步分别从形态学及细胞分子表型两方面,同时证实了STC1能够逆转TGF- $\beta$ 诱导的EMT过程。

研究表明,EMT形成与多种信号通路有关,主要包括TGF- $\beta$ /Smad<sup>[15]</sup>及WNT/ $\beta$ -catenin信号通路<sup>[16]</sup>。近年来发现钙离子信号也是其重要通路之一<sup>[5]</sup>,发现在COPD中存在钙离子激活现象<sup>[6]</sup>,阻止钙离子内流则可抑制气道EMT<sup>[8]</sup>,上述现象高度提示钙离子信号与COPD中EMT密切相关。STC1是一种在硬骨鱼肾脏发现的钙离子调节蛋白,最初研究发现,去除硬骨鱼肾脏的斯坦尼氏小体后,腮腺摄取钙离子增多,出现高钙血症,说明斯坦尼氏小体中存在钙离子调节蛋白。Wagner等<sup>[17]</sup>在1986年提纯了该蛋白,发现该蛋白能够抑制钙离子内流,维持体内钙离子稳态,后将该蛋白命名为斯钙素。以上结果提示STC1可能通过阻止钙离子内流,抑制支气管上皮细胞的EMT过程。

现已明确,STC1主要表达于肺支气管上皮<sup>[10]</sup>。作为最主要的外界损伤因素,长期香烟刺激促进了COPD的形成和发展;近期相关研究表明,香烟对气

道产生慢性损伤刺激的同时,可诱发机体的相关应激保护性机制,如抗氧化分子Nrf2的反应性表达增加<sup>[18]</sup>。本研究中,CSE刺激导致支气管上皮细胞表达STC1增加,可能也是属于上述机制之一。近期Westberg等<sup>[19]</sup>研究发现,在小鼠心肌缺血再灌注模型中,低氧可诱导心肌细胞STC1蛋白反应性增高;Tang等<sup>[20]</sup>同样发现,在小鼠急性肺损伤模型中,脂多糖刺激可诱导肺组织STC1蛋白表达呈现反应性增加,进一步证实STC1也是一种应激相关蛋白。因此本研究中,CSE能够通过NF- $\kappa$ B通路导致支气管上皮细胞STC1表达增加,可能也是细胞对香烟刺激的一种应激。

鉴于STC1对EMT的抑制作用,本研究认为支气管上皮STC1反应性表达增加,可能也是机体对香烟刺激损伤的一种保护性反应。由于STC1作为一种分泌型蛋白,可通过自分泌或旁分泌方式发挥作用<sup>[9]</sup>。研究表明STC1还可表达在间充质干细胞、肺泡II型细胞<sup>[11]</sup>,因此,不排除这些细胞也可能通过分泌STC1,以旁分泌方式作用于支气管上皮细胞抑制EMT。

综上所述,STC1作为一种调节钙离子的分泌型蛋白,在CSE刺激下,支气管上皮细胞STC1反应性表达增加,可能作为机体的一种应激保护性机制,其在一定程度上能够抑制气道EMT。外源给予足量的rhSTC1可能通过改善COPD患者气道EMT进程,成为COPD患者治疗的新靶点。

#### [参考文献]

- [1] Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report: GOLD executive summary[J]. Eur Respir J, 2017, 49(3):1700214
- [2] Nyunoya T, Mebratu Y, Contreras A, et al. Molecular processes that drive cigarette smoke-induced epithelial cell fate of the lung[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014, 50(3):471-482
- [3] Nowrin K, Sohal SS, Peterson G, et al. Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental underlying pathogenic process in COPD airways: fibrosis, remodeling and cancer[J]. Expert Rev Respir Med, 2014, 8(5):547-559
- [4] Sohal SS, Walters EH. Role of epithelial mesenchymal transition (EMT) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD)[J]. Respir Res, 2013, 14(1):120
- [5] Davis FM, Azimi I, Faville RA, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent[J]. Oncogene, 2014, 33(18):

- 2307-2316
- [6] Rasmussen JE, Sheridan JT, Polk W, et al. Cigarette smoke-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release leads to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) dysfunction [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(11): 7671-7681
- [7] Post S, Nawijn MC, Jonker MR, et al. House dust mite-induced calcium signaling instigates epithelial barrier dysfunction and CCL20 production [J]. *Allergy*, 2013, 68(9): 1117-1125
- [8] Arthur GK, Duffy SM, Roach KM, et al. KCa3.1  $\text{K}^+$  channel expression and function in human bronchial epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e145259
- [9] Yeung BH, Law AY, Wong CK. Evolution and roles of stanniocalcin [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 349(2): 272-280
- [10] Ito Y, Zemans R, Correll K, et al. Stanniocalcin-1 is induced by hypoxia inducible factor in rat alveolar epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452(4): 1091-1097
- [11] Ono M, Ohkouchi S, Kanehira M, et al. Mesenchymal stem cells correct inappropriate epithelial-mesenchyme relation in pulmonary fibrosis using stanniocalcin-1 [J]. *Mol Ther*, 2015, 23(3): 549-560
- [12] Gohy ST, Hupin C, Fregimilicka C, et al. Imprinting of the COPD airway epithelium for dedifferentiation and mesenchymal transition [J]. *Eur Respir J*, 2015, 45(5): 1258-1272
- [13] Takizawa H, Tanaka M, Takami K, et al. Increased expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(6): 1476-1483
- [14] Milara J, Peiro T, Serrano A, et al. Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke [J]. *Thorax*, 2013, 68(5): 410-420
- [15] Mahmood MQ, Reid D, Ward C, et al. Transforming growth factor (TGF)  $\beta$ 1 and Smad signalling pathways: A likely key to EMT-associated COPD pathogenesis [J]. *Respirology*, 2017, 22(1): 133-140
- [16] Zou W, Zou Y, Zhao Z, et al. Nicotine-induced epithelial-mesenchymal transition via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in human airway epithelial cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 304(4): L199-L209
- [17] Wagner GF, Hampong M, Park CM, et al. Purification, characterization, and bioassay of teleocalcin, a glycoprotein from salmon corpuscles of Stannius [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1986, 63(3): 481-491
- [18] Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(9): 1248-1259
- [19] Westberg JA, Serlachius M, Lankila P, et al. Hypoxic preconditioning induces elevated expression of stanniocalcin-1 in the heart [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(3): H1766-H1771
- [20] Tang SE, Wu CP, Wu SY, et al. Stanniocalcin-1 ameliorates lipopolysaccharide-induced pulmonary oxidative stress, inflammation, and apoptosis in mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 71(12): 321-331

[收稿日期] 2018-03-29

## 科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每3位分成1组,组间留空隙(约为一个汉字的1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如453 000 000可写成45 300万或4.53亿或4亿5 300万,但不能写成4亿5千3百万;三千元写成3 000元或0.3万元,但不能写成3千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如10%~20%, $(2\sim 6)\times 10^3$ 或 $2\times 10^3\sim 6\times 10^3$ ,30~40 km。