

烟曲霉菌提取物对人支气管上皮细胞修复功能的影响

龙飞¹, 苏莉莉¹, 梁斌¹, 金先桥²

(1. 山东大学附属省立医院呼吸科, 山东 济南 250021; 2. 复旦大学附属华山医院呼吸科, 上海 200040)

摘要:目的 探讨烟曲霉菌对呼吸道上皮细胞修复功能的影响及其可能机制。方法 实验分为正常对照组、不同浓度(10、20、40 mg/L) AFE组、热处理 AFE组。分别应用不同浓度和热处理的烟曲霉菌提取物(*aspergillus fumigatus* extract, AFE)作用体外培养的人支气管上皮细胞 16HBE 不同的时间,以细胞体外损伤修复功能、细胞迁移能力、定量细胞黏附能力、细胞伸展面积为指标,观察 AFE 和热处理的 AFE 对上皮细胞修复能力的影响。结果 20、40 mg/L AFE 均明显抑制 16HBE 细胞的体外损伤修复功能、细胞迁移能力和细胞黏附能力($P < 0.05$),并呈明显的时间和浓度依赖性。10 mg/L AFE 与正常对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。10、20、40 mg/L AFE 均明显抑制细胞的伸展能力($P < 0.05$),并呈明显浓度依赖性。另外,热处理 AFE 的蛋白酶完全灭活,对上述观察指标无明显影响($P > 0.05$)。结论 AFE 依赖其蛋白酶活性明显抑制细胞的修复功能,并呈明显的浓度和时间依赖性。

关键词:烟曲霉菌;支气管上皮细胞;修复功能;蛋白酶

中图分类号:R363

文献标志码:A

Effects of *Aspergillus fumigatus* extract on human bronchial epithelial cells repair ability

LONG Fei¹, SU Lili¹, LIANG Bin¹, JIN Xianqiao²

(1. Department of Respiratory Medicine, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong, China;

2. Department of Respiratory Medicine, Huashan Hospital Affiliated to Shanghai Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of *aspergillus fumigatus* extract (AFE) on the human bronchial epithelial cells repair ability and its possible mechanism. **Methods** The cells were divided into medium control group, different concentrations (10, 20 and 40 mg/L) of AFE groups and heat-treated AFE group. Human bronchial epithelial cells 16HBE were cultured *in vitro*, which were exposed to different concentrations of AFE for different time. Wound closure assay, cell migration, quantitative cell attachment assay and spreading of bronchial epithelial cells were observed. AFE and heat-treated AFE were used to investigate the effects of AFE on the human bronchial epithelial cells repair ability.

Results Compared with medium control group, the repair capacity, migration ability and adhesion ability of 16HBE cells were inhibited significantly in 20 and 40 mg/L groups ($P < 0.05$) with a time- and concentration-dependent manner; however, there was no obvious change in 10 mg/L AFE group ($P > 0.05$). The spreading ability of 16HBE cells in 10, 20 and 40 mg/L AFE groups were inhibited with a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). Heat-treated AFE, whose protease activities were lost, showed no effects on the indicators mentioned above ($P < 0.05$).

Conclusion AFE, depending on its protease activity, can inhibit the repair ability of human bronchial epithelial cells, which is positively related to the exposure time and concentration of AFE.

Key words: *Aspergillus fumigatus*; Bronchial epithelial cell; Repair ability; Protease

呼吸道上皮细胞不仅参与哮喘气道炎症和气道重构等重要的病理生理过程,其在哮喘患者早期过敏原致敏的过程中亦发挥关键作用^[1-2]。呼吸道上皮细胞完整屏障功能的结构基础是细胞间的紧密连接,可阻止吸入的抗原等大分子物质通过细胞间隙与上下皮抗原递呈细胞接触,亦可阻止过敏原透过呼吸道上皮细胞致敏机体;功能基础是上皮细胞的正常修复功能,这是控制气道炎症和疾病的重要途径^[3]。

以往研究发现,28.5%支气管哮喘患者的烟曲霉菌抗原皮肤试验呈阳性。烟曲霉菌感染与哮喘发病率^[4]、患者哮喘发作严重程度^[5],甚至重症哮喘的死亡率^[6]存在明显的相关性。因此近年来烟曲霉菌在哮喘发病中的作用逐渐受到重视^[7]。烟曲霉菌可明显促进哮喘大鼠气道炎症,提高气道反应性,损伤上皮细胞,加重气道重构及促进黏液蛋白的表达^[8-9]。另外,烟曲霉菌提取物(*aspergillus fumigatus* extract, AFE)明显促进人支气管上皮细胞黏液蛋白和 GM-CSF 的表达^[10-11]。但 AFE 对细胞修复功能的影响尚不明确。本研究以人支气管上皮细胞 16HBE 为研究对象,以细胞的损伤修复功能、移动性、黏附性和细胞伸展面积为观察指标,拟探讨 AFE 对细胞修复功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人支气管上皮细胞株 16HBE 由广州医学院李冰教授惠赠;合成培养基 AOAC、Zepeck 培养基与酪蛋白购自美国 Difco 公司;DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;新生牛血清购自美国 Hyclone 公司;Trizol 购自美国 Ivitrogen 公司;酶标板购自德国 Greiner 公司;BCA 法蛋白测定试剂盒购自上海捷瑞公司;I 型胶原纤维购自美国 Sigma 公司;所有引物均由上海生工生物技术公司合成,其他化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 AFM 的制备及蛋白酶活性鉴定 烟曲霉菌分离培养自山东省立医院患者痰液,其提取物制备方法参见文献[11-12]。冻干粉溶于无血清 DMEM,BCA 法蛋白定量,后续实验应用蛋白浓度。AFE 溶液置于 60℃ 30 min 行热处理^[11]。

1.2.2 细胞培养及实验分组 人支气管上皮细胞株 16HBE 常规培养于 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基,细胞生长至单层,培养基无血清 DMEM 继续培养 24 h。实验分为 5 组:①正常对照组:不给予任何处理;②10 mg/L AFE 组:给予 10 mg/L AFE

处理;③20 mg/L AFE 组:给予 20 mg/L AFE 处理;④40 mg/L AFE 组:给予 40 mg/L AFE 处理;⑤热处理 AFE 组:用热处理的 AFE 替代 AFE。

1.2.3 体外损伤修复实验^[13] 参照 Oertel 文献,细胞传代培养 3 d,换用无血清培养基培养 24 h。实验前更换新的无血清培养基。应用 20 μL 的移液器,Tip 头每个孔内分别在 3、6、9 和 12 点的位置划一下,使每两个划痕区域的面积基本相同。划痕结束后,PBS 漂洗细胞,继续孵育 1 h。根据分组加入相应浓度的 AFE 后立即显微镜下拍照,记录为 0 h,然后分别于 2、4、8 h 拍照,应用 ImageJ 软件计算划痕面积,按以下公式衡量细胞的损伤修复功能: $1 - (\text{时间点划痕面积} / \text{最初面积}) \times 100\%$ 。

1.2.4 Boyden 小室检测细胞的迁移能力^[14] 应用 10 μg/mL I 型胶原纤维包被 Boyden 小室的支持膜下层,备用。应用胰酶消化液(0.05% 胰酶 + 0.53 mmol/L EDTA),将培养的 16HBE 细胞消化成单个细胞后,洗涤细胞 1 次,调整密度为 10⁶ 个/mL。10⁵ 个细胞加到 Boyden 小室的上层,同时小室内、外加入不同浓度 AFE。将小室放入细胞培养箱内一定时间,取出后吸掉小室上层液体,擦掉小室内未迁移细胞。瑞氏染液染色约 3 min,倒置显微镜 200 倍镜下随机计数 10 个视野内细胞数,每个视野细胞数平均值用以衡量细胞的迁移能力。

1.2.5 细胞定量法检测细胞的黏附能力 根据 Dormond 方法并略加改动^[15],具体如下。用胰酶消化液将细胞消化成单个细胞,洗涤 2 次,调整密度为 10⁵ 个/mL。细胞加入到 96 孔培养板内,每孔 200 μL。向各组细胞加入不同浓度的 AFE。将细胞放入细胞培养箱内一定时间后取出,应用 37℃ PBS 将未贴壁细胞洗掉,每孔细胞内加入 0.5% 的结晶紫溶液,室温下 10 min,洗掉未被细胞摄取的结晶紫。倒置晾干培养板。每个培养孔内加入 200 μL 乙醇/乙酸(1/1, v/v) 混合液,充分溶解混匀,应用酶标仪测定 A₅₉₀。吸光度与细胞的贴壁数量呈正比,吸光度代表细胞的黏附能力。

1.2.6 细胞展开面积的测定 盖玻片泡酸 24 h 洗涤干净后,放入 24 孔培养板内备用。胰酶消化细胞并调整浓度为 10⁵ 个/mL。将细胞加入放有玻片的 24 孔培养板内,加入不同浓度 AFE,放入细胞培养箱内 1 h 后取出,PBS 洗掉未贴壁细胞,1% 多聚甲醛固定 20 min,0.01% 伊文蓝染色 10 min,PBS 冲洗,50% 甘油封片,荧光显微镜下观察并拍照。计算 100 个细胞面积的平均值。实验结果以各 AFE 组细胞面积与正常对照组细胞面积的比值表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间均数比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AFE 降低 16HBE 细胞的体外修复能力 见图 1、表 1。作用 2 h 时,20 mg/L AFE 组及 40 mg/L

AFE 组中 16HBE 细胞的修复能力受到明显抑制,与正常对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$); 10 mg/L AFE 组中 16HBE 细胞的修复能力虽受到抑制,但与正常对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。作用 2 h 时,20 mg/L AFE 组与 40 mg/L AFE 组差异无统计学意义($P > 0.05$),但作用 4 h 或 8 h 时,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。热处理 AFE 组中,AFE 蛋白酶活性完全丧失^[11],对细胞体外损伤修复能力无影响($P > 0.05$)。

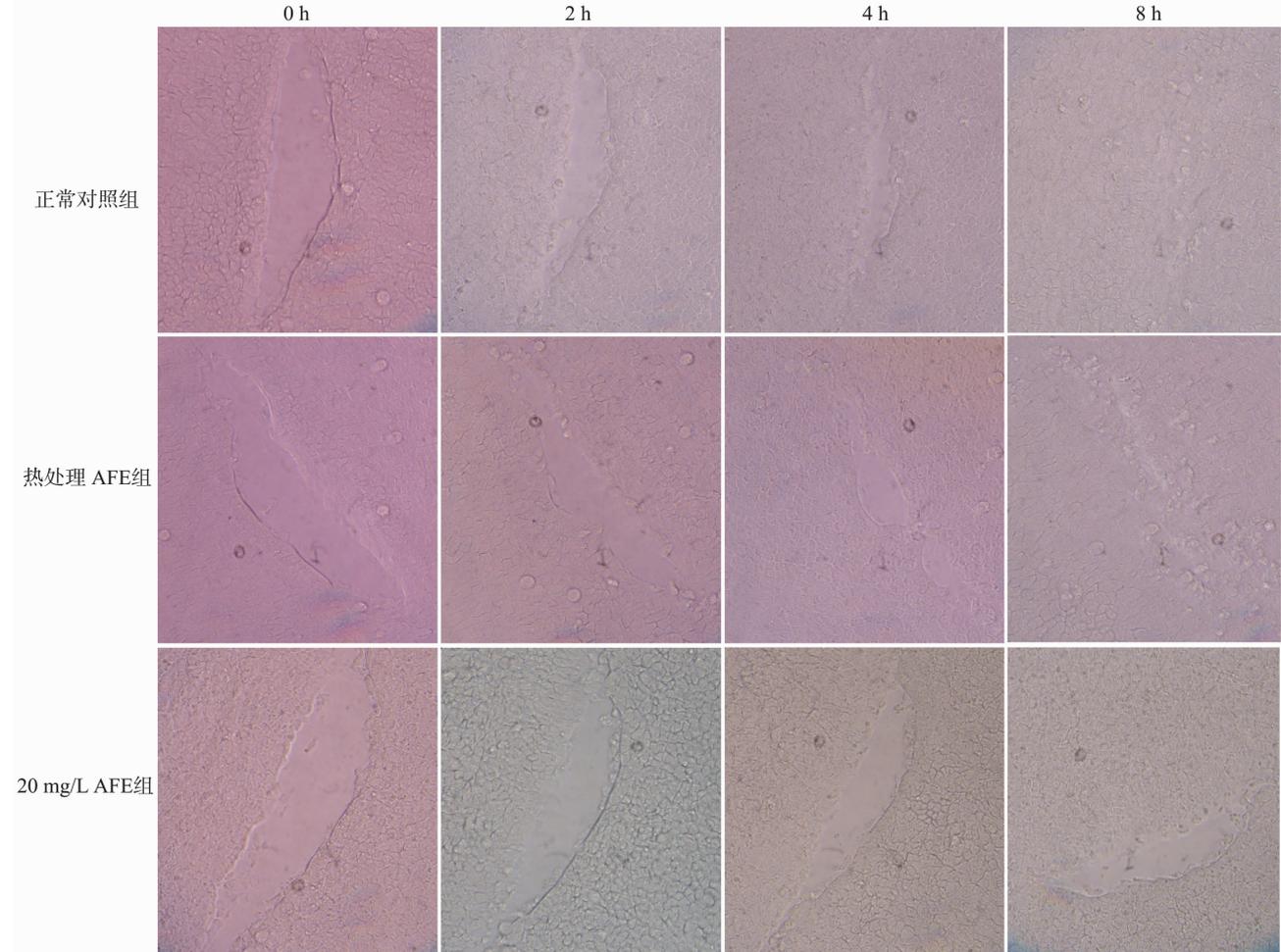


图 1 AFE 分别作用不同时间对细胞体外损伤修复的影响(×200)
Fig. 1 Effect of AFE on 16HBE wound closure at different time points(×200)

表 1 不同作用时间对各组细胞体外损伤修复功能的影响(%)

组别	2 h	4 h	8 h
正常对照组	34.5 ± 5.7	52.4 ± 6.5	98.6 ± 9.3
10 mg/L AFE 组	30.2 ± 5.7	43.7 ± 6.3	90.4 ± 9.7
20 mg/L AFE 组	25.4 ± 4.3 [#]	40.1 ± 5.8 ^{##}	80.1 ± 8.4 ^{##}
40 mg/L AFE 组	19.1 ± 4.2 [#]	32.4 ± 5.1 ^{##*}	70.3 ± 7.9 ^{##△}
热处理 AFE 组	35.5 ± 5.5	50.2 ± 6.8	97.9 ± 9.5

[#] $P < 0.01$, ^{##} $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^{*} $P < 0.05$ vs 20 mg/L AFE 组 4 h; [△] $P < 0.05$ vs 20 mg/L AFE 组 8 h。

2.2 AFE 降低 16HBE 细胞的迁移能力 见图 2、图 3。作用 2、4 及 8 h 时,20 mg/L AFE 组及 40 mg/L AFE 组中 16HBE 细胞的迁移能力受到明显抑制,

与正常对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$),且两组间差异亦有统计学意义($P < 0.05$); 10 mg/L AFE 组中细胞迁移能力虽受抑制,但与正常对照组

相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);热处理 AFE 组中细胞迁移能力无影响($P > 0.05$)。

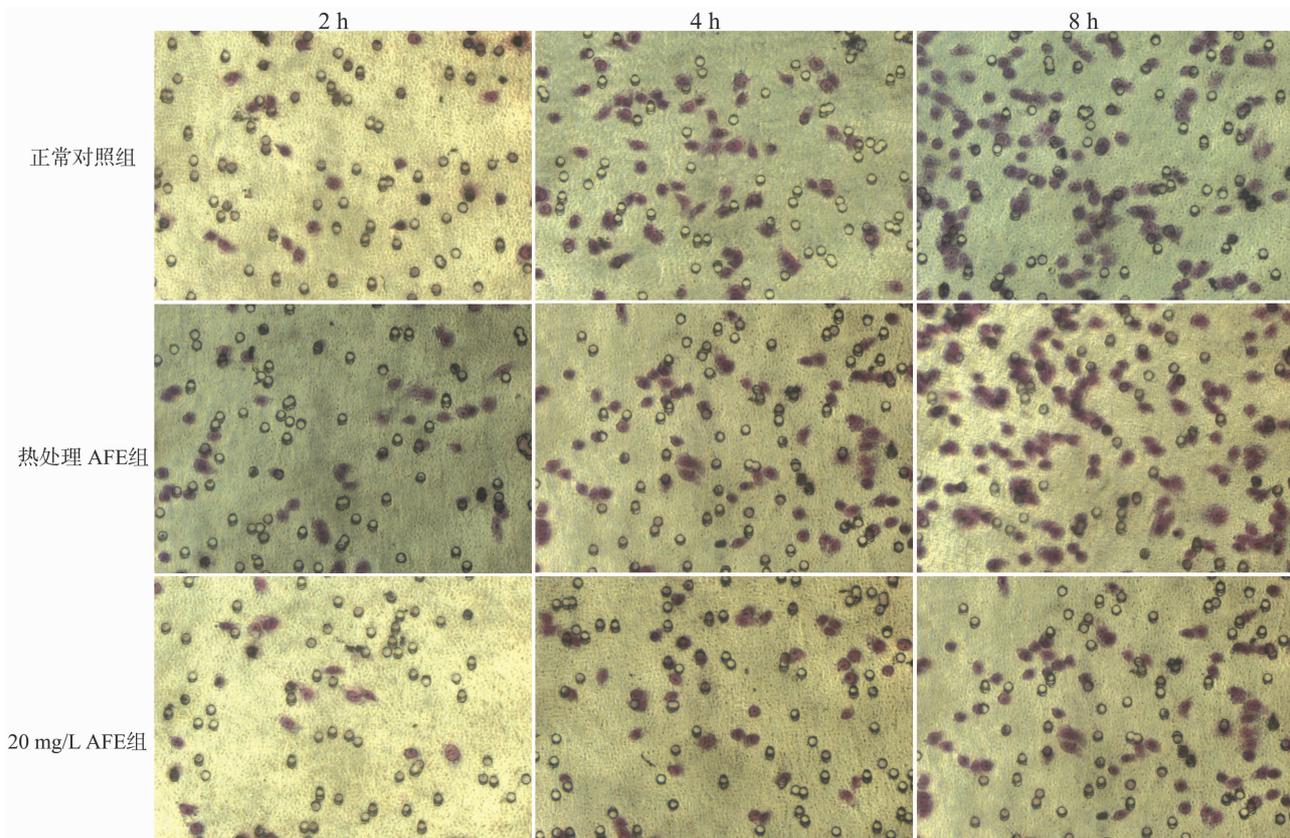


图2 AFE 分别作用 2、4、8 h 对细胞小室内迁移能力的影响($\times 200$)

Fig.2 Effect of AFE on 16HBE cell migration at different time points($\times 200$)

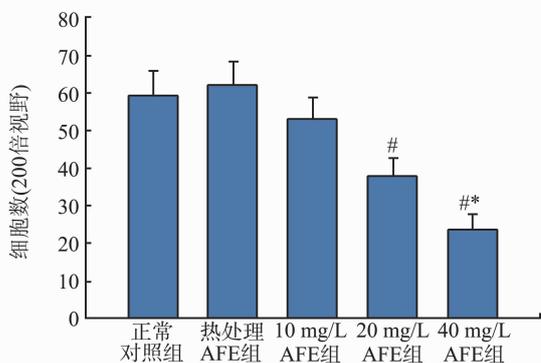


图3 不同浓度 AFE 作用 4 h 对细胞小室内迁移能力的影响

[#] $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^{*} $P < 0.05$ vs 20 mg/L AFE 组。

Fig.3 Effects of different concentrations of AFE on 16HBE cell migration at 4 h.

[#] $P < 0.01$ vs the medium control group; ^{*} $P < 0.05$ vs 20 mg/L AFE group.

2.3 AFE 降低 16HBE 细胞的黏附能力 见表 2。作用 2、4 及 8 h 时,20 mg/L AFE 组及 40 mg/L AFE 组中 16HBE 细胞的黏附能力均受到抑制($P < 0.01$),并呈明显浓度依赖性;10 mg/L AFE 组中细胞黏附能力虽受抑制,但与正常对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);20 mg/L AFE 组与 10 mg/L AFE 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。热处理 AFE 组中细胞黏附能力无影响($P > 0.05$)。

2.4 AFE 降低 16HBE 细胞的伸展能力 见图 4、图 5。10、20 及 40 mg/L AFE 组中 16HBE 细胞的伸展能力均受到抑制($P < 0.05$),并呈明显浓度依赖性;不同浓度组之间差异有统计学意义(P 均 < 0.05);热处理 AFE 组中细胞伸展能力无影响($P > 0.05$)。

表2 不同作用时间对各组细胞黏附能力的影响

组别	A_{590}		
	2 h	4 h	8 h
正常对照组	0.262 ± 0.021	0.318 ± 0.018	0.366 ± 0.029
10 mg/L AFE 组	0.257 ± 0.016	0.316 ± 0.008	0.325 ± 0.039
20 mg/L AFE 组	0.240 ± 0.013 [#]	0.283 ± 0.016 [#]	0.302 ± 0.027 [#]
40 mg/L AFE 组	0.216 ± 0.021 ^{##}	0.232 ± 0.014 ^{##}	0.157 ± 0.029 ^{##}
热处理 AFE 组	0.265 ± 0.021	0.322 ± 0.017	0.366 ± 0.032

[#] $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^{*} $P < 0.05$ vs 20 mg/L AFE 组。

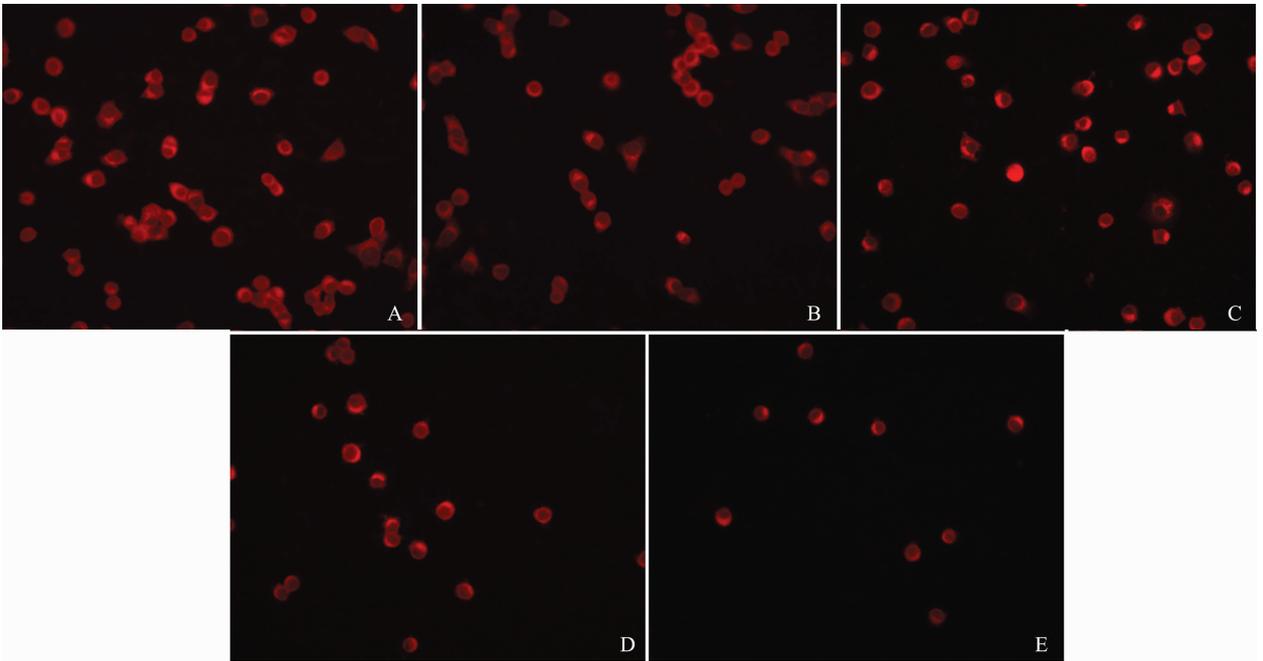


图4 各组细胞伸展能力

A: 正常对照组; B: 热处理 AFE 组; C: 10 mg/L AFE 组; D: 20 mg/L AFE 组; E: 40 mg/L AFE 组。

Fig. 4 Cell spreading abilities of different groups

A: Medium control group; B: Heat-treated AFE group; C: 10 mg/L AFE group; D: 20 mg/L AFE group; E: 40 mg/L AFE group.

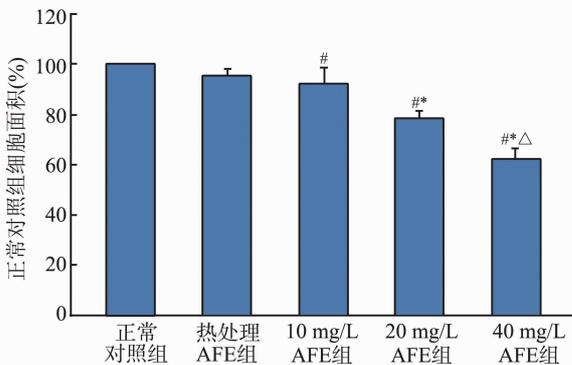


图5 不同浓度 AFE 对细胞伸展能力的影响

[#] $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^{*} $P < 0.05$ vs 10 mg/L AFE 组; [△] $P < 0.05$ vs 20 mg/L AFE 组。

Fig. 5 Effect of different concentrations of AFE on 16HBE cell spreading

[#] $P < 0.05$ vs medium control group; ^{*} $P < 0.05$ vs 10 mg/L AFE group; [△] $P < 0.05$ vs 20 mg/L AFE group.

3 讨论

呼吸道上皮细胞在气道内形成紧密的屏障,吸入的有害物质及气道慢性炎症常常导致细胞脱落,使上皮下的基底膜直接与空气中的有害物质接触,从而导致气道炎症加重和气道的高反应性^[16]。上皮细胞受到损伤脱落后,损伤部位周围的细胞在几分钟内即可变扁平、伸展开并向损伤部位移动,重新覆盖损伤部位,此过程被称为“再上皮化”^[17]。上

皮细胞正常的修复功能是预防和控制哮喘等过敏性疾病的过敏原致敏和气道炎症的重要因素。

前期动物实验表明,反复吸入烟曲霉菌孢子可导致呼吸道上皮细胞出现细胞损伤和脱落^[9],由此推测烟曲霉菌孢子除了对上皮细胞具有直接和间接损伤外,还可能影响上皮细胞的修复功能。因此,本体外实验检测了 AFE 对支气管上皮细胞修复功能的影响,观察体外损伤修复功能、细胞移动性、细胞定量黏附功能和细胞伸展功能的变化。结果表明,20 mg/L 和 40 mg/L 的 AFE 即可降低细胞的上述修复功能指标;而前期实验发现,低于该浓度的 AFE 对细胞的直接损伤并不明显。因此,低于损伤浓度的 AFE 即可降低上皮细胞的修复功能,对于早期接触烟曲霉菌的患者导致过敏原致敏具有重要意义。烟曲霉菌具有明显的蛋白酶活性,可通过直接损伤和感染后炎症反应两种途径损伤上皮细胞功能,并降低上皮细胞的修复功能,进而导致损伤部位不易修复,使炎症细胞聚集,加重气道的炎症反应。

细胞的正常修复功能依赖于整合素,其在细胞移动过程中发挥关键作用^[18]。整合素为 α 、 β 两个亚单位的跨膜蛋白,空间结构似细胞膜上的“搭扣”。静止细胞中,细胞膜上的整合素无活性,与细胞外基质配体不结合。受外界因素损伤后,边缘细胞出现极化,细胞头部的整合素活化,与细胞外基质的配体紧密链接,同时细胞尾部的整合素松解,使细

胞向前移动,活化细胞内的信号转导通路。整合素与细胞外基质的配体必须通过蛋白酶作用后才能解离^[19]。由于 AFE 具有明显的蛋白酶活性^[11],由此推测 AFE 的蛋白酶活性使上皮细胞膜上的整合素不易与细胞外基质配体结合,或过早的解离整合素与配体的结合体,从而降低细胞的修复功能。

本研究还发现,经过热处理后,AFE 的蛋白酶活性完全丧失,对细胞修复功能无任何影响,由此推测,AFE 依赖其蛋白酶活性,降低细胞的修复功能,使损伤部位直接与外界过敏原接触,并使炎症细胞聚集在损伤部位,因此降低细胞修复功能可能是烟曲霉菌促进早期过敏原致敏和加重哮喘的途径之一。

参考文献:

- [1] Proud D, Leigh R. Epithelial cells and airway diseases [J]. *Immunol Rev*, 2011, 242(1):186-204.
- [2] Holgate S T, Lackie P, Wilson S, et al. Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162(3):113-117.
- [3] Spurzem J R, Veys T, Devasure J, et al. Ethanol treatment reduces bovine bronchial epithelial cell migration [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005, 29(4):485-492.
- [4] O' Hollaren M T, Yunginger J W, Offord K P, et al. Exposure to an aeroallergen as a possible precipitating factor in respiratory arrest in young patients with asthma [J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(6):359-363.
- [5] Maurya V, Gughani H C, Sarma P U, et al. Sensitization to *Aspergillus* antigens and occurrence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with asthma [J]. *Chest*, 2005, 127(4):1252-1259.
- [6] Knutsen A P, Bush R K, Demain J G, et al. Fungi and allergic lower respiratory tract diseases [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(2):280-291.
- [7] Fukahori S, Matsuse H, Tsuchida T, et al. *Aspergillus fumigatus* regulates mite allergen-pulsed dendritic cells in the development of asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2010, 40(10):1507-1515.
- [8] 王妍,龙飞,祁卉卉,等. 烟曲霉菌孢子对哮喘大鼠气道炎症和气道反应性的影响 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2007, 30(7):546-547.
WANG Yan, LONG Fei, QI Huihui, et al. Effects of *Aspergillus fumigatus* spores on airway inflammation and airway responsiveness in asthmatic rat model [J]. *Chinese Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2007, 30(7):546-547.
- [9] 高福生,龙飞,祁卉卉,等. 吸入烟曲霉菌孢子对哮喘大鼠气道上皮重构和 MUC5AC 表达的影响 [J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2008, 28(9):1095-1099.
GAO Fusheng, LONG Fei, QI Huihui, et al. Effect of inhalations of *Aspergillus fumigatus* spores on airway epithelium remodeling and expression of MUC5AC in rat asthma [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University: Medical Science*, 2008, 28(9):1095-1099.
- [10] 龙飞,高福生,丁星,等. 烟曲霉菌提取物对人支气管上皮细胞粒-巨噬细胞付诸集落刺激因子表达的影响 [J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29(8):917-920.
LONG Fei, GAO Fusheng, DING Xing, et al. Effects of *Aspergillus fumigatus* extract on expression of GM-CSF in human bronchial epithelial cells [J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2008, 29(8):917-920.
- [11] 龙飞,高福生,丁星,等. 烟曲霉菌提取物对人支气管上皮细胞 Muc5ac 表达的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(2):327-332.
LONG Fei, GAO Fusheng, DING Xing, et al. Effects of *Aspergillus fumigatus* extract on expression of Muc5ac in human bronchial epithelial cells [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2009, 25(2):327-332.
- [12] Kauffman H F, Tomee J F, van de Riet M A, et al. Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 105(6 pt 1):1185-1193.
- [13] Oertel M, Graness A, Thim L, et al. Trefoil factor family-peptides promote migration of human bronchial epithelial cells: synergistic effect with epidermal growth factor [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 25(4):418-424.
- [14] Chwieralski C E, Schnurra I, Thim L, et al. Epidermal growth factor and trefoil factor family 2 synergistically trigger chemotaxis on BEAS-2B cells via different signaling cascades [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31(5):528-537.
- [15] Dormond O, Bezzi M, Mariotti A, et al. Prostaglandin E2 promotes integrin $\alpha v \beta 3$ -dependent endothelial cell adhesion, rac-activation, and spreading through cAMP/PKA-dependent signaling [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(48):45838-45846.
- [16] Erjefält J S, Korsgren M, Nilsson M C, et al. Association between inflammation and epithelial damage-restitution processes in allergic airways in vivo [J]. *Clin Exp Allergy*, 1997, 27(11):1344-1355.
- [17] Erjefält J S, Erjefält I, Sundler F, et al. In vivo restitution of airway epithelium [J]. *Cell Tissue Res*, 1995, 281(2):305-316.
- [18] Juliano R L, Reddig P, Alahari S, et al. Integrin regulation of cell signalling and motility [J]. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32(Pt3):443-446.
- [19] Palecek S P, Horwitz A F, Lauffenburger D A. Kinetic model for integrin-mediated adhesion release during cell migration [J]. *Ann Biomed Eng*, 1999, 27(2):219-235.