

葛根素对黑火药烟雾诱导支气管上皮细胞 IL-8 和 IL-6 基因表达的抑制作用

周 莹, 王成彬, 兰晓梅

[摘要] 目的 研究葛根素对黑火药烟雾诱导支气管上皮细胞表达 IL-8 及 IL-6 基因的抑制作用。方法 用黑火药烟雾刺激支气管上皮细胞, 用实时 PCR 方法定量检测黑火药烟雾刺激后支气管上皮细胞中 IL-8 及 IL-6 基因表达水平的变化; 黑火药烟雾刺激前支气管上皮细胞培养液中加入葛根素, 观察葛根素对黑火药烟雾刺激支气管上皮细胞表达 IL-8 及 IL-6 基因的抑制作用。结果 烟雾刺激 24 h 后, IL-6 及 IL-8 基因表达分别增加 1.534 ± 0.653 倍和 2.231 ± 0.054 倍; 支气管上皮细胞在烟雾刺激前 8 h 加入不同浓度葛根素培养, 黑火药烟雾诱导 IL-6 和 IL-8 的基因表达被显著抑制, 并呈剂量依赖性。结论 黑火药烟雾可诱导支气管上皮细胞炎性细胞因子 IL-6、IL-8 mRNA 表达增加, 葛根素可抑制黑火药烟雾刺激支气管上皮细胞炎性细胞因子 IL-6、IL-8 mRNA 表达。

[关键词] 葛根素; 烟雾吸入性损伤; IL-6; IL-8; 基因表达

[中图分类号] R966

[文献标志码] A

[文章编号] 1008-9926(2012)01-010-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2012.01.03

Puerarin Inhibits Gene Expression of IL-8 and IL-6 in BEAS-2B Cells Injured by Black Powder Smoke

ZHOU Ying, WANG Cheng-bin, LAN Xiao-mei

Department of Clinical Laboratory, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

[Abstract] **Objective** To study the inhibition effect of puerarin on gene expression of IL-8 and IL-6 in BEAS-2B cells stimulated by black powder smoke. **Methods** BEAS-2B cells were stimulated by black powder smoke. The gene expression of IL-8 and IL-6 of the cells was determined by real-time PCR. Puerarin was added to BEAS-2B cells before being stimulated by black powder smoke. The gene expression of IL-8 and IL-6 in BEAS-2B cells injured by black powder smoke was detected. **Results** After being injured by black powder smoke for 8 h, the gene expression of IL-8 and IL-6 of BEAS-2B cells was up-regulated (1.534 ± 0.653 fold and 2.231 ± 0.054 fold respectively). When different concentrations of puerarin were added to BEAS-2B cells 24 h before smoke stimulation, the gene expression of IL-6 and IL-8 in the cells was significantly inhibited in a dose-dependent manner. **Conclusion** Black powder smoke increases the gene expression of inflammatory cytokine IL-6 and IL-8 and this is inhibited by puerarin effect.

[Key words] puerarin; smoke inhalation injury; IL-6; IL-8; gene expression

支气管上皮是人体呼吸道接受外界有害物质刺激的第一道屏障, 这些有害物质包括有害气体、过敏原、微生物等。近年来的研究表明, 支气管上皮细胞(BEAS-2B)受到有害物质刺激后还可作为效应细胞分泌多种细胞因子等炎性介质, 如脂质介质、细胞因子、活性氧簇、活性氮群等, 从而进一步增加气道组织的病理生理学改变^[1]。

黑火药是由碳粉、硫磺粉以及硝酸钾机械混合而成的。燃烧时会释放大量烟雾, 其主要成分包括 CO_2 、 CO 、 NO 和 SO_2 等有毒气体以及碳颗粒。黑火药无论是在军用还是民用过程中其烟雾都可能引起人体的气道损伤, 本课题拟通过细胞培养, 观察火药烟雾刺激后 BEAS-2B 细胞内细胞因子基因表达的变化, 探讨火药烟雾所致气道损伤及葛根素防护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 细胞: BEAS-2B 细胞株(由军事医学科学院放射医学研究所朱茂祥教授馈赠)。

基金项目: 军队十一五计划国际合作项目, No. 06H045

作者简介: 周 莹, 在读硕士。研究方向: 战时气道上皮应激介导的炎症反应机理及防治措施研究。Tel: (010) 66937391

作者单位: 100853 北京, 解放军总医院临床检验科

通讯作者: 王成彬, Tel: (010) 68241369; E-mail: wangcb301@126.com

1.2 试药 葛根素注射液(规格: 100 mg/2 ml, 湖南康普制药有限公司, 批号: 090801)。DMEM/F12 (1:1) 培养基(美国 Hyclone 公司) 特级胎牛血清(北京元亨金马生物技术开发有限公司) 硝酸钾、碳粉为分析纯 硫磺粉(纯度 99.9% 200 目, 北京西四化工原料公司)。总 RNA 提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司) TransStart™ Green 定量 PCR 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司) TransScript First-strand cDNA Synthesis Supermix 试剂盒(TransGen 公司) 实验所用引物(均由上海生物工程技术服务有限公司合成) 热循环仪(Bio-Rad 公司)。

1.3 细胞培养 所使用 DMEM/F12 (1:1) 培养基加入 100 U/ml 青霉素、0.1 mg/ml 链霉素及 10% 已灭活特级胎牛血清。细胞于 37℃ 5% CO₂ 的培养箱中培养, 每 3~4 d 换液或传代^[2]。

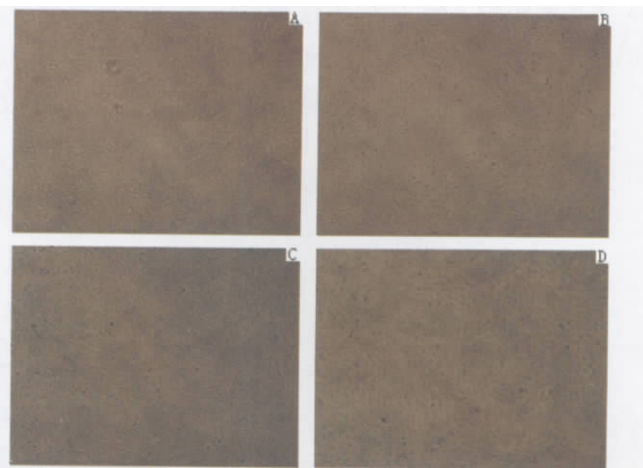
1.4 分组 实验分为 5 组, 正常对照组、烟雾刺激组、烟雾刺激 + 高剂量葛根素(100 μg/ml) 组、烟雾刺激 + 中等剂量葛根素(50 μg/ml) 组、烟雾刺激 + 低剂量葛根素(25 μg/ml) 组, 葛根素均于培养 12 h 后加入。

1.5 黑火药烟雾致 BEAS-2B 细胞损伤模型建立及细胞处理 在 24 孔板每孔加入 1.0 ml 密度为 20 000/ml 细胞悬液, 普通培养 12 h 至细胞贴壁生长后加入葛根素刺激, 继续培养 24 h 至细胞贴壁率超过 80%, 见图 1。烟雾刺激前去除细胞表面培养液使用无菌磷酸盐缓冲液清洗 2 遍, 之后加盖将培养板放入烟雾吸入平台^[2], 黑火药(配比: 硝酸钾 75% 碳 15% 硫 10%) 剂量固定为 2 g, 烟熏时间固定为 10 min, 烟雾和 BEAS-2B 细胞充分接触后将培养板取出, 迅速加入 1.0 ml 培养液继续培养, 建立 BEAS-2B 细胞损伤模型。继续培养 2、6、8、12 h 后, 吸弃上清, 用 4℃ 预冷磷酸盐缓冲液冲洗贴壁生长的 BEAS-2B 细胞表面 3 次, 之后按照每 10 cm² 培养面积加入 1 ml Trizol 的比例, 直接将细胞裂解液加入孔板。

1.6 总 RNA 提取及检测 按照 Solarbio 总 RNA 提取试剂盒描述的方法提取裂解细胞的总 RNA。取 2 μl RNA 样本, 加入 98 μl RNase free ddH₂O, 置于 Eppendorf BioPhotometer plus 核酸分析仪中进行纯度和浓度测定, 取 A₂₆₀/A₂₈₀ 值在 1.8~2.0 的 RNA 进行逆转录。

1.7 cDNA 合成 采用 TransScript First-strand cDNA Synthesis Supermix 试剂盒进行逆转录。每支 RNase free 离心管中加入 2.5 μl Oligo(dT) 18 2.5 μl Tran-

Script RT/RI Enzyme Mix 25 μl 2 × TS Reaction Mix, 1 μg RNA, 最后用 RNase free ddH₂O 将反应体系补充至 50 μl。轻轻混匀, 置 Bio-Rad MJ mini 热循环仪上以 42℃ 孵育 30 min, 之后 85℃ 加热 5 min 灭活 TransScript RT。



A: 单独培养; B: 加入 25 μg/ml 葛根素;

C: 加入 50 μg/ml 葛根素; D: 加入 100 μg/ml 葛根素;

图 1 BEAS-2B 细胞单独培养及加入不同浓度葛根素处理培养 (10 × 40)

1.8 实时 PCR 反应 实验所用引物序列见表 1 25 μl 反应体系包括: 上游引物(10 μmol/L) 0.5 μl, 下游引物(10 μmol/L) 0.5 μl 2 × TransStart Green qPCR SuperMix 12.5 μl 模板 2 μl ddH₂O 9.5 μl。扩增条件: 96℃ 180 s 预变性; 94℃ 30 s 60℃ 30 s 72℃ 60 s 共 35 个循环; 之后 95℃ 60 s 53℃ 60 s。扩增完成后从 50℃ 升温做溶解曲线验证扩增产物的特异性。

表 1 用于 PCR 的引物序列及产物长度

基因	序列
IL-6	F5'-TACCCCAAGGAGAAGATTCC-3'
	R5'-TTTCTGCCAGTGCCTCTTT-3'
IL-8	F5'-CTGTGTGAAGGTGCAGTTTGGCC-3' ^[3]
	R5'-CTCAGCCCTCTTCAAAAACCTTCTCC-3'
GAPDH	F5'-GAAGGTGAAGGTGCGAGTC-3' ^[4]
	R5'-GAAGATGCTGATGGGATTTC-3'

1.9 葛根素对火药烟雾刺激 BEAS-2B 细胞炎性细胞因子基因表达的影响 按 1.4 所述方法分组, 按 1.5 项所述方法建模, 葛根素于培养 12 h 细胞贴壁后加入。烟雾刺激后继续培养 8 h, 收集细胞, 之后按前述方法进行炎性细胞因子基因检测。

1.10 统计方法 实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 采用统

计学软件 SPSS 18.0 进行分析 数据经过正态性检验和方差齐性检验后 进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 烟雾刺激 BEAS-2B 细胞对 IL-6 和 IL-8 基因表达的影响 经 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法相对定量分析火药烟雾刺激 BEAS-2B 细胞后不同时间 IL-6 和 IL-8 基因的表达 随着烟雾刺激后继续培养时间的延长, BEAS-2B 细胞中 IL-6 和 IL-8 基因表达分别增加 6.452 ± 2.095 倍、 2.935 ± 1.202 倍 ($P < 0.01$), 并于培养

后 8 h 达到峰值。而继续培养至 12 h, 炎性细胞因子表达下降, 见图 2。扩增效率及溶解曲线见图 3。

2.2 葛根素对烟雾刺激 BEAS-2B 细胞 IL-6 和 IL-8 基因表达的影响 烟雾刺激 8 h 后, BEAS-2B 细胞中 IL-6 及 IL-8 基因表达分别增加 1.534 ± 0.653 倍和 2.231 ± 0.054 倍 ($P < 0.01$); BEAS-2B 细胞在烟雾刺激前加入不同浓度葛根素 培养 24 h 后烟雾刺激 烟雾刺激 8 h 后 BEAS-2B 细胞中 IL-6 和 IL-8 基因表达被显著抑制, 并呈剂量依赖性, 见图 4。扩增效率及溶解曲线见图 5。

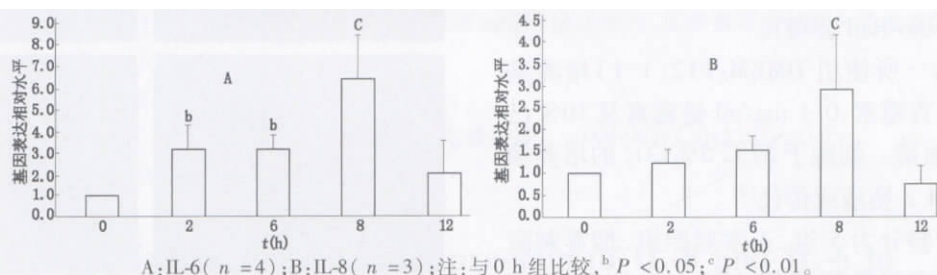
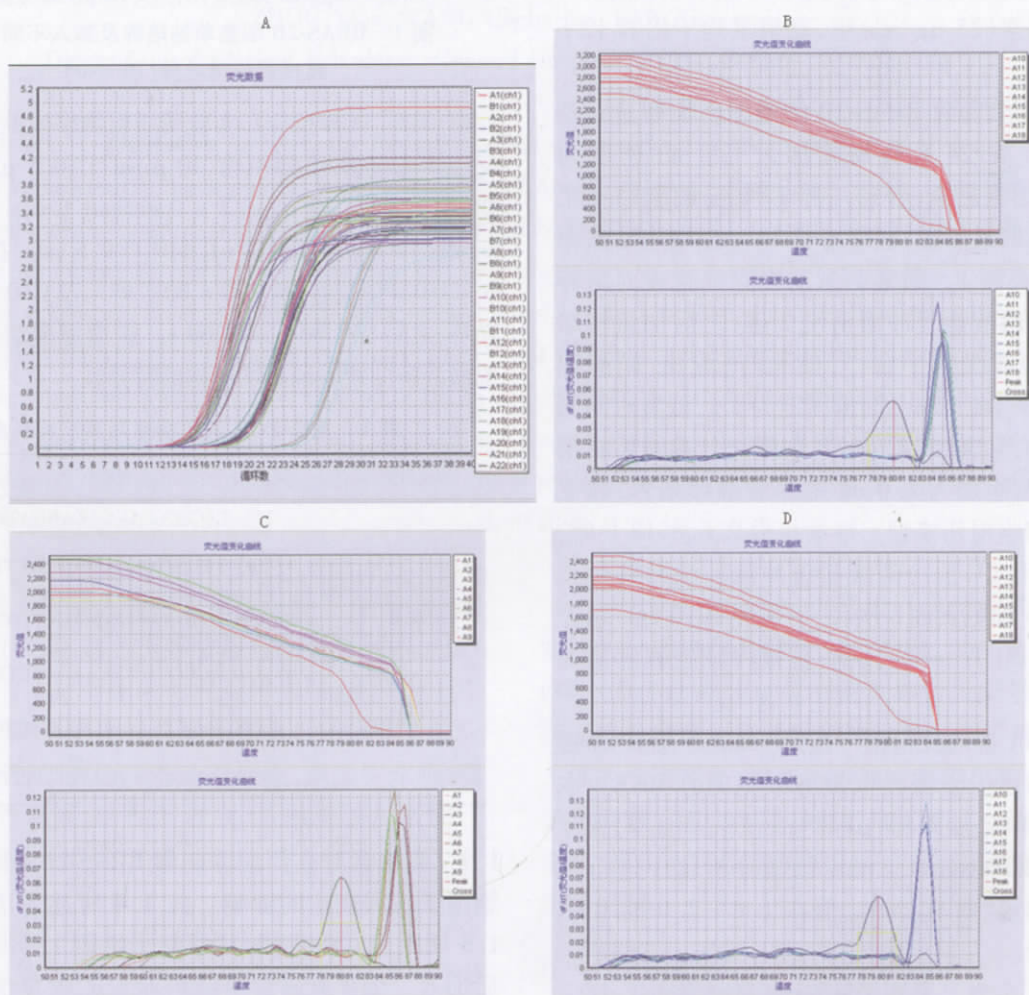
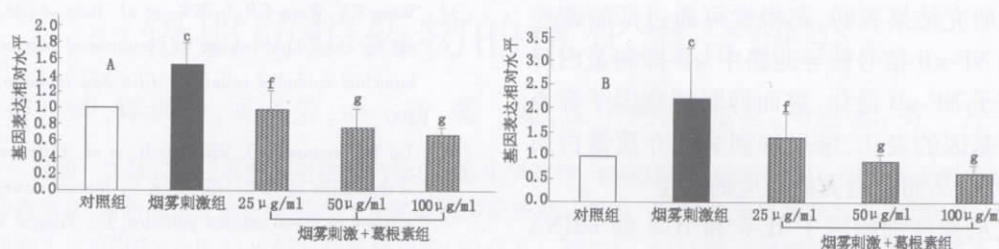


图 2 黑火药烟雾刺激损伤不同时间 BEAS-2B 细胞 IL-6 和 IL-8 基因表达水平后继续培养



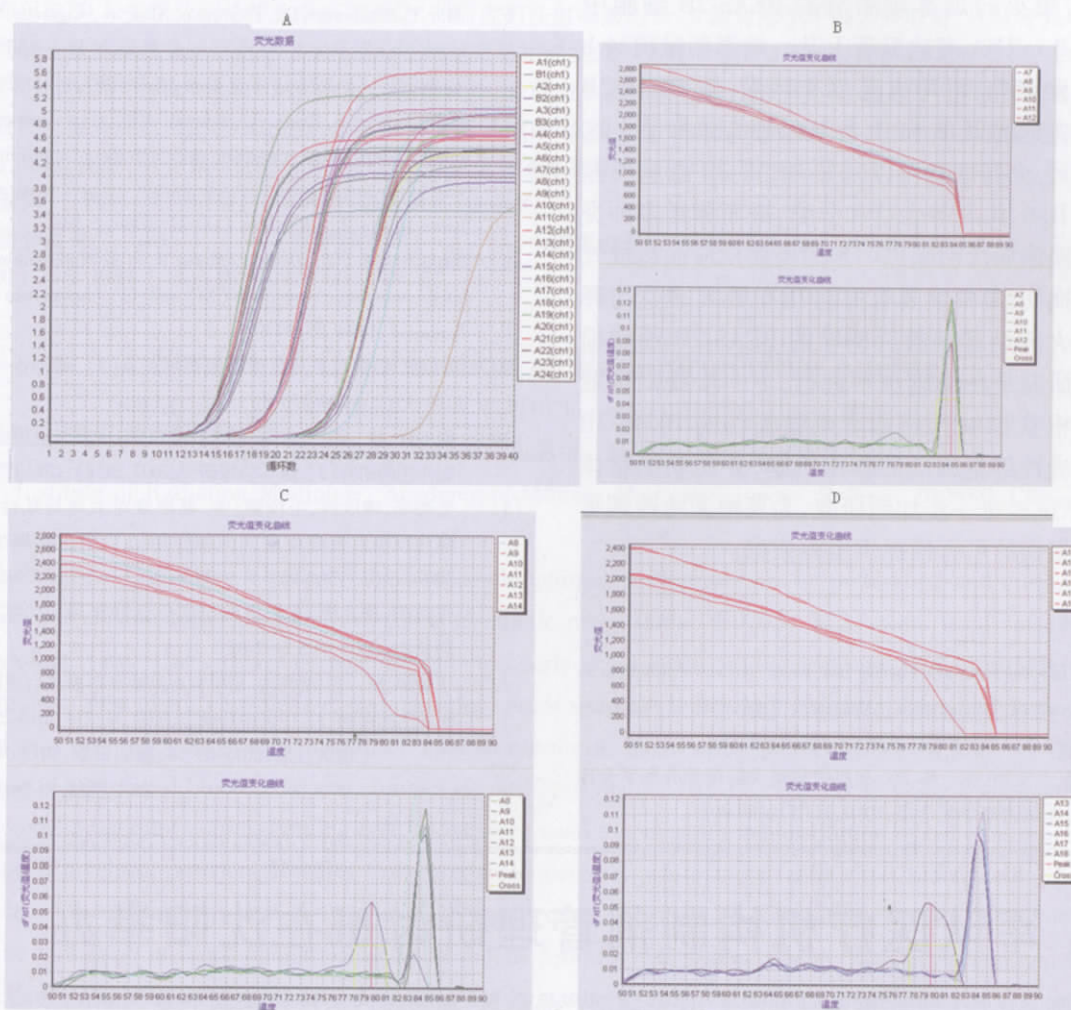
A: 扩增曲线; B: IL-8 基因溶解曲线; C: IL-6 基因溶解曲线; D: GAPDH 基因溶解曲线

图 3 实时 PCR 扩增曲线及溶解曲线



A: IL-6 ($n=4$); B: IL-8 ($n=3$); 注: 与对照组比较, $P < 0.01$; 与烟雾刺激组比较, $^f P < 0.05$; $^g P < 0.01$ 。

图 4 黑火药烟雾刺激损伤 8h 后 BEAS-2B 细胞 IL-6 和 IL-8 基因表达水平及葛根素的防护作用



A: 扩增曲线; B: IL-8 基因溶解曲线; C: IL-6 基因溶解曲线; D: GAPDH 基因溶解曲线

图 5 实时 PCR 扩增曲线及溶解曲线 (烟雾刺激后 8h)

3 讨论

大量的研究表明, 细胞因子 IL-6 和 IL-8 是两种重要的致炎因子^[1,5,6]。BEAS-2B 细胞接受外界刺激后产生原初细胞因子, 如 TNF- α 等, 这些原初细胞因子进一步作用于 BEAS-2B 细胞介导其释放次级细胞因子如 IL-6、IL-8 等。次级细胞因子分别有各自功能, 作用于不同组织引起炎症反应。

IL-6 是一种多效性细胞因子, 可诱导急性时相

反应蛋白的产生和释放, 调节多种细胞功能, 包括细胞增殖、分化、免疫防御等, 并有协同 B 淋巴细胞分泌免疫球蛋白调控局部及全身炎症的免疫反应^[1,7]。

IL-8 属于 C-X-C 趋化因子家族, 是一种强力中性粒细胞趋化和活化因子, 具有很强的促进中性粒细胞形态改变、穿透组织、脱颗粒、表面黏附分子表达和活性氧分子生成与释放等功效, 在气道炎症中起重要作用^[6,8,9]。

大量的研究表明,葛根素可通过抑制调控炎症反应的 NF- κ B 信号转导通路中 κ B 抑制蛋白降解抑制核因子 NF- κ B 活化,进而抑制细胞因子等炎症介质蛋白基因的表达,结果抑制炎症性介质的合成与释放,从而抑制炎症反应的发生^[10-13]。

本研究从炎症细胞因子 IL-6 和 IL-8 的 mRNA 表达水平入手,研究火药烟雾刺激后 BEAS-2B 细胞中 IL-6 和 IL-8 mRNA 表达情况及葛根素的影响。结果表明,黑火药烟雾刺激后的 BEAS-2B 细胞中 IL-6 和 IL-8 mRNA 表达显著上升。烟雾刺激前 24 h 加入葛根素培养,再用火药烟雾刺激,则 BEAS-2B 细胞中高表达的 IL-6 和 IL-8 基因被有效抑制。这一结果表明,火药烟雾可以诱导 BEAS-2B 细胞炎症细胞因子 IL-6、IL-8 等表达和分泌,进而募集多种炎症细胞至损伤病灶引起进一步的炎症反应而造成气道损伤,葛根素具有抑制 IL-6、IL-8 表达与释放和防护火药烟雾刺激后诱导的 BEAS-2B 细胞损伤。本文研究是在细胞水平进行,下一步我们将继续探讨葛根素抑制火药烟雾刺激损伤的 BEAS-2B 细胞分泌炎症细胞因子的作用机制,并从动物整体水平、临床试验进一步加强研究,为葛根素防治烟雾所致气道损伤的可行性提供实验依据。

[参考文献]

- [1] Martin LD ,Rochelle LG ,Fischer BM ,et al . Airway Epithelium as an Effector of Inflammation: Molecular Regulation of Secondary Mediators [J]. *Eur Respir J* ,1997 ,10: 2139-2148
 - [2] 冯亮,兰亚婷,庞伟,等.火药烟雾吸入毒理学分析平台建设[J]. *军医进修学院学报* 2010 ,31(5): 489-491
 - [3] Wong CK ,Wang CB ,Ip WK ,et al . Role of p38 MAPK and NF- κ B for chemokine release in coculture of human eosinophils and bronchial epithelial cells [J]. *Clin Exp Immuno* ,2005 ,135: 90-100
 - [4] Tal TL ,Simmons SO ,Silbajoris R ,et al . Differential transcriptional regulation of IL-8 expression by human airway epithelial cells exposed to diesel exhaust particles [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* ,2010 ,243: 46-54
 - [5] Beisswenger C ,Platz J. Exposure of differentiated airway epithelial cells to volatile smoke in vitro [J]. *Respiration* ,2004 ,71: 402-409
 - [6] Mio T ,Romberger DJ ,Thompson AB ,et al . Cigarette Smoke Induces Interleukin-8 Release from Human Bronchial Epithelial Cells [J]. *Am J Respir Crit Care Med* ,1997 ,155: 1770-1776
 - [7] Halappanavar S ,Russell M ,Stampfli MR ,et al . Induction of the interleukin 6/signal transducer and activator of transcription pathway in the lungs of mice sub-chronically exposed to mainstream tobacco smoke [J]. *Bio Med Central* ,2009 ,2: 56
 - [8] Baggiolini M . ,B. Dewald ,Moser B ,et al . Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines [J]. *Adv Immunol* ,1994 ,55: 97-197
 - [9] 段立彬. 细胞因子与急性肺损伤的关系 [J]. *蚌埠医学院学报* ,2010 ,35(2): 208-210
 - [10] 周玉皆,詹珊,王志英. 葛根素对 COPD 大鼠气道炎症及气道重塑作用的研究 [J]. *医学临床研究* 2007 ,24(8): 1249-1251
 - [11] 姜海燕,魏欣冰,王汝霞,等. 葛根素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后炎症反应的抑制作用 [J]. *中国病理生理杂志* ,2007 ,23(2): 366-369
 - [12] 张远荣,蒋企洲. 葛根素的抗氧化活性作用 [J]. *实用临床医药杂志* 2005 ,9(5): 92-93
 - [13] 丁美萍,封菲,胡海涛. 葛根素对脑缺血再灌注后核因子 kappa B 表达的影响 [J]. *中国中药杂志* 2007 ,32(23): 2515-2517
- (收稿日期: 2011-09-14; 修回日期: 2011-10-20)
(本文编辑 金杨红)

军队医疗机构制剂管理研讨班在沈阳举办

为提高军队医疗机构制剂管理水平,保证制剂产品质量,加强军内医疗机构制剂室之间的经验交流,经解放军总政治部干部部和总后勤卫生部批准,全军一类继续医学教育项目"军队医疗机构制剂管理研讨班",于 2011 年 12 月 21 日至 23 日在沈阳举办。此次研讨班由解放军第二〇二医院承办,来自各大军区、军兵种 110 多个单位的 250 多名代表参加了研讨班。研讨班得到了总部、沈阳军区、医院各级领导的关怀和支持。研讨会上,总后卫生部药品仪器检验所和各医院的专家对制剂监管、新制剂申报、制剂质量标准以及工艺验证、制剂信息化管理等关键技术做了具体的指导,对于提高制剂水平、保证制剂质量具有很好的指导意义。来自总部医院、中心医院、门诊部、疗养院的专家分别介绍各自医院的特色成功经验,对未来全军医疗机构制剂室的建设和发展提出了很好的建设性指导意见。

研讨会期间,制剂专家和与会代表一起对全军制剂室新一轮换证验收工作进行了总结,对于存在的问题以及整改办法进行了交流;还对全军制剂抽检结果进行了总结分析,对提升制剂室管理水平和保证制剂产品质量,为全军医疗机构制剂室的可持续发展奠定了良好的基础。

(解放军 202 医院药剂科 王强报道)