

# Elafin 重组腺病毒载体在气道 上皮细胞中表达的时相性变化研究<sup>①</sup>

杜先智, 周向东

重庆医科大学 附属第二医院呼吸内科, 重庆 400010

**摘要:** 为研究 elafin 重组腺病毒表达载体 Ad-elafin 转染气道上皮细胞的特性, 探讨其在上皮细胞中表达的时相性变化, 运用①应用原代培养技术培养人气道上皮细胞; ②Ad-elafin 表达载体转染气道上皮细胞; ③在转染后不同的时相中, 采用荧光显微镜观察报告基因 GFP 的表达, ELISA 法单克隆抗体检测细胞上清液 elafin 蛋白的表达, Northern 膜杂交检测 elafin 基因 mRNA 的表达量等方法进行研究. 发现: ①原代培养人气道上皮细胞约 5 d 即可作为靶细胞。②转染 Ad-elafin 24 h 时, 荧光显微镜下可见上皮细胞内有少量的 GFP 表达, 随着时间的延长, 细胞内荧光逐渐增加, 96 h 时 GFP 荧光阳性的细胞约为 80%。③转染 24~96 h, 实验组细胞上清液 elafin 的含量高于对照组 ( $p < 0.01$ ); 同时 elafin mRNA 的水平高于对照组 ( $p < 0.05, 0.01$ ), 且 elafin 表达及 elafin mRNA 水平在一定时间内呈时间依赖性关系. 结论: Elafin 重组腺病毒表达载体 Ad-elafin 成功转染人气道上皮细胞, 目的基因不仅能在上皮细胞中表达, 而且 elafin 蛋白具有细胞外分泌作用.

**关键词:** Elafin; 上皮细胞; 气道

**中图分类号:** R562

**文献标识码:** A

正常情况下, 支气管肺组织面临许多炎性损伤因素, 为维持肺脏正常的生理功能, 存在相应的抗炎性损伤因素, 两者处于一个动态平衡过程. 引起支气管、肺组织破坏的炎性损伤因素主要是蛋白酶类, 其中中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)起主要作用, 尽管已发现多种 NE 抑制剂, 但自然分布于支气管-肺组织的抗 NE 损伤性因子主要有三种, 即  $\alpha_1$  抗胰蛋白酶( $\alpha_1$ -AT)、分泌型白细胞蛋白酶抑制剂(secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI)、elafin. 目前国外对 elafin 的研究是热点, 虽然许多组织的粘膜部位可产生 elafin, 但在呼吸道, elafin 主要是由肺泡上皮细胞、Clara 细胞以及肺泡巨噬细胞表达. 我们采用原代培养人气道上皮细胞、转染 elafin 重组腺病毒表达载体 Ad-elafin, 研究 Ad-elafin 在气道上皮细胞中表达的时相性变化及其意义.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 组织标本

肺组织源于重庆医科大学第一附属医院胸外科男性肺癌患者, 年龄在 50~70 岁之间, 因肺癌而行肺组

① 收稿日期: 2006-10-10

基金项目: 重庆市应用基础研究项目(200332)

作者简介: 杜先智(1964-), 男, 四川广安人, 博士, 副教授, 主要从事气道损伤与修复的研究.

通讯作者: 周向东, 教授. E-mail: ZXD999@263.net

织切除的正常肺组织作为获取支气管标本。

### 1.1.2 Elafin 重组腺病毒表达载体 Ad-elafin

本研究集体构建。

### 1.1.3 主要试剂

胰蛋白酶(Sigma 公司)、抗角蛋白免疫组化试剂盒(华美公司)、脂质体 Lipofectamine 2000、Trizol 提取试剂(Invitrogen 公司)、预杂交液(北京鼎国生物公司)、地高辛标记试剂盒(德国 Roche 公司)、杂交试剂盒(武汉博士德生物公司)、ELISA 试剂盒(武汉博士德生物公司)。

### 1.1.4 主要溶液

标本收集培养液:含有青霉素( $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、链霉素( $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )和两性霉素( $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的 1:1 的 DMEM-F 12; 培养液:包括 1:1 DMEM-F 12, 含有  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  转铁蛋白、 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  氢化可的松、 $1\%$  硒酸钠、 $5 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  维生素 A 酸、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  胰岛素、10 万 IU/L 青霉素、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  链霉素、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  庆大霉素、 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  两性霉素和  $10\%$  胎牛血清、 $25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  EGF、 $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  谷氨酰胺、 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  三碘甲状腺氨酸、 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  霍乱毒素。

## 1.2 方法

### 1.2.1 支气管上皮细胞原代培养技术

参照文献[1]的方法进行。气道上皮细胞按  $2 \times 10^3$  个细胞/孔接种 96 孔培养中, 24 h 后用感染复数 250 的 Ad-elafin 转染, 不同时间荧光显微镜下观察荧光蛋白(GFP)的表达, 当 70% 的细胞表达 GFP 时, 进行分组实验。

### 1.2.2 Northern 膜杂交

包括地高辛 cRNA 探针的制备、杂交前准备、细胞总 RNA 提取、预杂交、杂交、洗膜、封闭、滴加生物素化鼠抗地高辛抗体、滴加 SABC、滴加生物素化过氧化物酶、DAB 显色、图象分析(NC 膜用薄层色谱扫描仪扫描, 根据扫描曲线下的面积即光密度面积积分, 计算 mRNA 的相对含量)

### 1.2.3 ELISA 法检测细胞上清液 elafin 水平

采用 ELISA 法检测孕育 1, 2, 3, 4 d 后的细胞上清液 elafin 水平, 抗 elafin IgG(1:500)包被及后续步骤按 ELISA 试剂盒说明书操作, 在 ELISA 检测仪上, 于 450 nm 处, 以空白对照孔调零后测各孔吸光度 OD 值表示。

## 2 统计学处理

测定值均以  $\bar{x} \pm s$  表示, SPSS10.0 统计软件处理。

## 3 结果

### 3.1 重组腺病毒转染气道上皮细胞绿色荧光蛋白表达

重组腺病毒 Ad-elafin 转染气道上皮细胞 24 h, 荧光显微镜下可见到气道上皮细胞内有少量的 GFP 表达(图 1), 随着时间的延长, 细胞内的 GFP 表达越来越强, 在转染后 96 h, 几乎 80% 的上皮细胞 GFP 呈阳性表达(图 2)。

### 3.2 重组腺病毒 Ad-elafin 在气道上皮细胞 elafin 基因的 mRNA 表达

重组腺病毒 Ad-elafin 转染气道上皮细胞后, 不同时间内用地高辛标记 elafin cRNA 探针行膜杂交, 各组杂交膜光密度面积积分随着时间的延长, 面积积分逐渐增加, 在 72 h 时, 为  $0.92 \pm 0.11$ , 在 96 h 时, 已降为  $0.86 \pm 0.09$ 。各时间段 Ad-elafin 组 elafin 基因的 mRNA 面积积分显著高于对照组, 与对照组的差异具有统计学意义(表 1)。

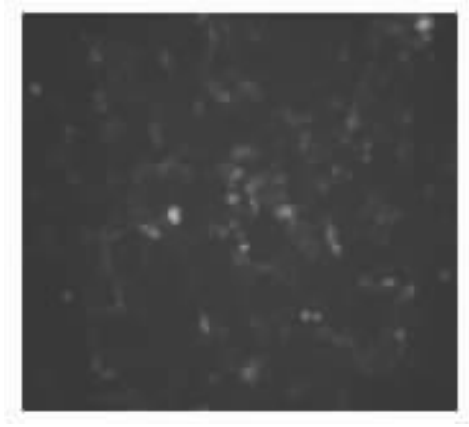


图 1 Ad-Elafin 转染气道上皮细胞 24 h 后, 在荧光显微镜下观察到的 GFP 表达情况  $\times 200$

Fig. 1 GFP Expression Was in Human Airway Epithelial Cells Infected Ad-elafin for 24 h Observed by Bfluorescence Microscopy in Cells  $\times 200$

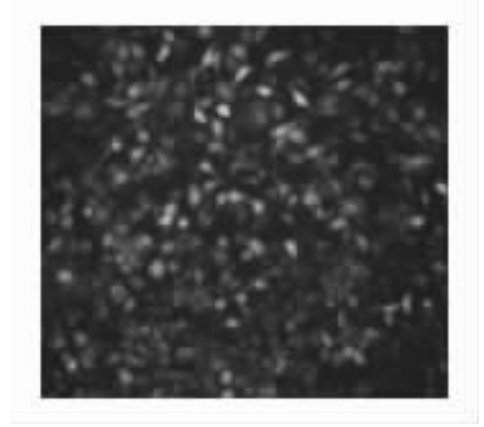


图 2 Ad-Elafin 转染气道上皮细胞 96 h 后, 在荧光显微镜下观察到的 GFP 表达情况  $\times 200$

Fig. 2 GFP Expression Was in Human Airway Epithelial Cells Infected Ad-elafin for 96 h Observed by Bfluorescence Microscopy in Cells  $\times 200$

表 1 Ad-elafin 转染气道上皮细胞 elafin mRNA 表达(Northern blot 杂交膜光密度面积积分  $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 The elafin-mRNA Express in Ad-elafin Transfecting Human Primary Airway Epithelial (light density integral of Northern blot hybridization membrane)

	时 间/h			
	24	48	72	96
Ad-elafin 组	$0.42 \pm 0.05^*$	$0.62 \pm 0.08^*$	$0.92 \pm 0.11^*$	$0.86 \pm 0.09^*$
对照组	$0.25 \pm 0.03$	$0.27 \pm 0.02$	$0.23 \pm 0.04$	$0.28 \pm 0.05$

\* 分别与对照组相比较  $p < 0.01$ , 具有统计学意义.

### 3.3 重组腺病毒 Ad-elafin 转染气道上皮细胞 elafin 的分泌

重组腺病毒 Ad-elafin 转染气道上皮细胞后, 不同时间段的细胞上清液 elafin 蛋白含量表现为时间依赖关系, 在 96 h 时, elafin 蛋白含量已达  $(8.8 \pm 1.7) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 各时间段 Ad-elafin 转染组显著高于对照组, 与对照组的差异具有统计学意义(表 2).

表 2 重组腺病毒 Ad-elafin 转染气道上皮细胞 elafin 的分泌( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Elafin Content of Cell in Ad-elafin Transfecting Human Primary Airway Epithelial Cultivating Fluid

	时 间/h			
	24	48	72	96
Ad-elafin 组/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$2.2 \pm 0.4^*$	$4.4 \pm 0.5^{**}$	$7.2 \pm 1.1^{**}$	$8.8 \pm 1.7^{**}$
对照组/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$1.9 \pm 0.3$	$2.2 \pm 0.4$	$2.1 \pm 0.3$	$2.0 \pm 0.3$

\* 与对照组相比较,  $p < 0.05$ , \*\* 分别与对照组相比较  $p < 0.01$ , 具有统计学意义.

## 4 讨 论

Elafin 最初在人类皮肤、肺分泌物中发现, elafin 又名弹性蛋白酶特异性抑制因子 (elastase-specific inhibitor) 或皮肤起源的抗白细胞蛋白酶 (skin-derived antileucoproteinase, SKALP), 属于“trappin”家族, 最新被命名为 Trappin-2, 翻译它的蛋白质是由 117 个氨基酸(包括 22 个氨基酸信号肽)组成的 12.3 kD 的阳离子多肽, 称为 Pre-elafin. 在切除信号肽后, 该蛋白质变成分子量为 9.9 kD 的成熟蛋白—elafin, 其 C 末

端与弹性蛋白酶的结合后起抗蛋白酶的作用; N末端通过共价铰链与 ECM 中的蛋白组分(如层粘连蛋白)以及上皮细胞膜呈覆盖性连接,从而使 ECM 及上皮细胞免受中性粒细胞弹性蛋白酶的破坏溶解<sup>[2]</sup>。

编码它的基因位于 20q11.2-q13.1,长约 2.3 kb,由 3 个外显子和 2 个内显子组成,5'端有典型的 TATA 和 CAAT 盒<sup>[3]</sup>。elafin 能被位于 5'端未翻译区的 NF- $\kappa$ B 调节<sup>[4]</sup>,故其转录可受 NF- $\kappa$ B 相关的细胞信号转导事件所调控。现已发现许多组织的黏膜部位也可产生 elafin,且在多种上皮细胞中可以协同表达<sup>[5]</sup>,痰中可分离纯化出 elafin,病人和正常人群的气管活检和支气管肺泡灌洗液中也有 elafin 的表达。

在呼吸道,elafin 主要是由肺泡上皮细胞、Clara 细胞以及肺泡巨噬细胞在炎性刺激诱导下表达,而常见致炎因子及炎症反应顺序产物如内毒素(LPS)、防御素、白介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、NE 等均能诱导 elafin 的产生。它出现在肺周围,免疫组化显示巨噬细胞是 elafin 的主要来源。而 elafin 由于其与组织结构蛋白结合样式的分布特点,其作用则更倾向于对肺间质的保护。

本研究利用手术标本获得支气管上皮细胞,进行原代培养,5 天时,细胞融合达 70%,在抗角蛋白抗体阳性证实为气道上皮细胞后,再将成功构建的重组腺病毒表达载体 Ad-elafin 感染气道上皮细胞,利用报告基因蛋白 GFP 能在 450~490 nm 的蓝光激发下发出绿光的特性,在倒置荧光显微镜下直接观察,GFP 基因是目前发现的唯一能在细胞内表达且不需要其他外源性底物参加的全新报告基因。实验发现气道上皮细胞转染 Ad-elafin 24 h 后内开始出现荧光,主要分布在胞质中,随着时间延长,细胞内荧光越来越强,96 h 时几乎 80%的细胞呈 GFP 阳性。

气道慢性炎性疾病病理状态下,NE 的过量与其拮抗剂的不足,肺间质损伤持续存在,损伤后修复难于有效进行,最终造成气道不可逆的损伤。要干预这一过程,办法之一可将 elafin 基因转染到气道上皮细胞并表达,当支气管肺组织在遭遇炎性因子时,表达 elafin 的量得以增加,从而拮抗 NE 对支气管肺组织的损伤。Henriksen<sup>[6]</sup>研究表明,转染了腺病毒携带 elafin 基因的人内皮细胞和巨噬细胞,能有效地削弱那些依赖  $\kappa$ -B 的炎性因子所致动脉粥样化生的炎性反应。

利用基因防治疾病,在有效载体携带目的基因进入靶细胞后,必须要有目的基因转录。我们将 elafin 重组腺病毒表达载体转染气道上皮细胞后的不同时相内,Northern 斑点杂交显示上皮细胞中 elafin mRNA 水平明显高于对照组,转染 24~72 h 之间,mRNA 水平呈时间依赖性关系,在 96 h 时已下降,这证明重组腺病毒 Ad-elafin 其 elafin 基因可在气道上皮细胞中实现表达。同时采用 ELISA 测定的细胞上清液 elafin 蛋白也明显高于对照组,在转染 24~96 h 之间,elafin 蛋白含量也呈时间依赖性关系,表明 Ad-elafin 转染气道上皮细胞后,不仅 elafin 基因可转录,而且翻译的 elafin 蛋白质可分泌到细胞外,这就为发挥 elafin 的生物学效应提供了机会。

Elafin 重组腺病毒表达载体成功转染气道上皮细胞,并且 elafin 基因在分子及蛋白质水平获得表达,为进一步探讨 elafin 的生物学作用机制,为气道慢性损伤的防治带来一定的希望。

## 参考文献:

- [1] Qin XQ (秦晓群), Sun XH (孙秀泓), Luo ZQ (罗自强). Vasoactive intestinal peptide and epidermal growth factor up-regulates bcl-2 gene expression in bronchial epithelial cells[J]. Acta Physiol Sin (生理学报), 1999, 51: 419-424 (in Chinese with English abstract).
- [2] Schalkwijk J, Wiedow O, Hirose S. The trappin gene family: proteins defined by an N-terminal transglutaminase substrate domain and a C-terminal four-disulphide core[J]. Biochem J, 1999, 15, 340 (Pt 3): 569-577.
- [3] Robinson PA, Leek JP, Carr IM, et al. Yeast artificial chromosome cloning and chromosomal localization of the abundant odontogenic keratocyst protein elafin[J]. Arch Oral Biol, 1996, 41(5): 445-452.
- [4] Zhang M, Zhou Z, Maass N, et al. Differential expression of elafin in human normal mammary epithelial cells and carcinomas is regulated at the transcriptional level[J]. Cancer Res, 1995, 15, 55(12): 2537-2541.
- [5] King AE, Critchley HO, Sallenave JM, et al. Elafin in human endometrium; an antiprotease and antimicrobial molecule

expressed during menstruation[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(9): 4426 – 4431.

- [6] Henriksen PA, Hitt M, Xing Z, et al. Adenoviral gene delivery of elafin and secretory leukocyte protease inhibitor attenuates NF-kappaB-dependent inflammatory responses of human endothelial cells and macrophages to atherogenic stimuli [J]. *J Immunol*, 2004, 172(7): 4535 – 4544.

## Changes of the Expression of Ad-Elafin in Human Primary Airway Epithelial Cell

DU Xian-zhi, ZHOU Xiang-dong

*Department of Respiratory Medicine, The Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China*

**Abstract:** Objective To realize the characteristics of primary airway epithelial cells transfected with Ad-elafin, and to research of the expression of Ad-elafin in these cells. Methods The primary airway epithelial cells was employed in this study, and then was transfected with Ad-elafin. The GFP expression in airway epithelial cells was observed by fluorescence microscopy, the authors have examined the effect of human elafin on the transcription and secretion protein with the light density integral of Northern blot hybridization membrane from cellular RNA and ELISA techniques. Results: The GFP expression was observed in airway epithelial cells transfected with Ad-elafin for 24 hours, and almost 80% cells has been expressed GFP for 96 hours, the concentrations ranging from  $(2.2 \pm 0.4) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  and  $(8.8 \pm 1.7) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  resulted in a significant increase in the secreted elafin protein as measured in the cell supernatant, and also the light density integral of Northern blot hybridization membrane ranging from  $0.42 \pm 0.05$  and  $0.86 \pm 0.09$  resulted in a significant increase in the transcription elafin gene as analyzed in cellular mRNA. Moreover the elafin protein secreted and mRNA expressed in a time-dependent manner. Conclusions: The human elafin gene can be expressed and elafin protein can be secreted in the human primary airway epithelial cell with transfecting Ad-elafin.

**Key words:** elafin; epithelial cells; airway

责任编辑 胡 杨