

SiO₂ 对大鼠肺泡巨噬细胞原癌基因 *c-sis* 表达影响的体外研究

王玉双, 孙树勋, 张尚明

(华北煤炭医学院, 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 探讨 SiO₂ 对大鼠肺泡巨噬细胞原癌基因 *c-sis* 表达的影响以期进一步了解原癌基因 *c-sis* 在矽肺发病中的作用。方法 采用支气管肺泡灌洗方法获得肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophage, AM)。体外予 SiO₂ 对 AM 进行不同时间的处理, 利用 RT-PCR 方法检测 *c-sis* mRNA 表达, 结果用计算机自动分析系统进行定量分析。结果 AM 中 *c-sis* 在 SiO₂ 处理后存在高表达, 处理时间不同其表达量也不同, 30 min 即有表达, 1 h 表达达高峰, 以后随处理时间的延长表达量逐渐下降, 各时间点结果与不加 SiO₂ 处理的同期对照组相比差异均有显著性 ($P < 0.01$)。结论 SiO₂ 可诱导 AM 原癌基因 *c-sis* 出现高表达, 提示原癌基因 *c-sis* 可能参与矽肺纤维化早期的形成。

关键词: SiO₂; 肺泡巨噬细胞; 原癌基因; *c-sis*; 血小板源生长因子

中图分类号: O613.72; R363.21 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)04-0203-03

Study on the effect of SiO₂ on the expression of pro-oncogene *c-sis* in rat alveolar macrophages in vitro

WANG Yu-shuang, SUN Shu-xun, ZHANG Shang-ming

(North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of SiO₂ on the expression of pro-oncogene *c-sis* in rat alveolar macrophages in order to know the function of *c-sis* in forming of silicosis. **Method** Alveolar macrophages were collected by bronchoalveolar lavage and silica particles were alveolar macrophages culture media. RT-PCR was used to detect the expression of *c-sis*, the results were analyzed quantitatively by Bio-Rad 100 gel-image density analytical system. **Result** Alveolar macrophages treated by SiO₂ could induce *c-sis* mRNA excessive express at 1 hour after SiO₂ exposure their express quantity reached peak. Compared with control, their expressed quantities at different culture times were all more than that of controls. **Conclusion** SiO₂ could induce alveolar macrophages *c-sis* excessive express and which might play an important role in forming of the silicosis.

Key words: SiO₂; Alveolar macrophage; Pro-oncogene; PDGF-B

矽肺的主要病理改变是肺成纤维细胞 (FB) 过度增殖, 胶原沉积, 矽结节形成^[1]。从分子水平研究肺 FB 增殖及胶原分泌的机制是寻找抑制 FB 增殖, 防止矽肺纤维化发展的重要环节。近年来的许多研究表明^[2]: 一些增殖性疾病如肺纤维化、类风湿、动脉粥样硬化等与某些原癌基因的过度表达和/或抑癌基因的失活和突变有关, 其中原癌基因 *c-myc* 与矽肺发病的关系已得到证实^[3]。血小板源生长因子 (PDGF) 是一种强致分裂因子, 直接参与了矽肺纤维化的形成, 而作为 PDGF-B 链的结构基因——原癌基因 *c-sis*^[4] 在矽肺纤维化的形成中是否存在高表达尚未见报道。本实验即从分子水平来探讨 *c-sis* 在矽肺发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2002-05-17; 修回日期: 2003-04-19

基金项目: 国家自然科学基金资助 (课题号: 39570286)

作者简介: 王玉双 (1965-), 女, 硕士, 副主任医师, 现在河北唐山中医院工作

实验动物为健康雄性 Wistar 大鼠, 体质量 250 g 左右。主要试剂: (1) SiO₂ 实验用标准石英粉: 购自中国预防医学科学院劳卫所, 其游离 SiO₂ 含量 > 97%, 分散度为 5 μm 以下者占 99.9%, 粉尘颗粒于 200 °C 干热灭菌 6 h, 用无血清 DMEM 培养液制成 100 mg/ml 的悬液, 4 °C 储存备用。(2) 细胞培养试剂、RT-PCR 相关分子生物学试剂: 购自北京华美生物工程公司。(3) 引物: 中国科学院微生物研究所合成。*c-sis* 引物序列^[5] 为上游 5' CCCAGCCCCCACCCTGGC3', 下游 5' GGGCAATACAGCAAATACCA3', 扩增片段为 867 bp。β-actin 引物: 上游 5' AAGGATTCCTATGTG GGC3', 下游 5' GATCTCTTGCTCGAAGTC3', 扩增片段为 532 bp。

1.2 方法

1.2.1 支气管肺泡灌洗 (BAL)、巨噬细胞的富集、纯化^[6]及分组 AMs 参考文献 [6] 通过支气管肺泡灌洗获得。收集灌洗液, 离心得细胞沉淀加入无血清 DMEM 培养液制成细胞悬液, 常规计数, 并经台盼蓝染色证实活细胞达 95% 以上后用质量分数

15%胎牛血清及双抗的培养液稀释成相对密度为 5×10^5 个/ml 的细胞悬液, 接种至培养瓶内 (每瓶细胞总数为 2.5×10^6 个), 置 37°C , 体积分数 5% CO_2 培养箱内培养 2 h, 使其贴壁后倒掉培养液及未贴壁的巨噬细胞和其他细胞。分组: (1) 实验组 (AM_s 组): 用含 SiO_2 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的无血清培养液加入 AM 中; (2) 对照组 (AM_c 组): 用不含 SiO_2 的无血清培养液加入 AM 中。两组分别孵育 30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h 后提取细胞总 RNA。

1.2.2 巨噬细胞总 RNA 的提取 上述培养瓶内巨噬细胞孵育至相应时间后提取 AM 总 RNA (严格按照试剂盒说明进行操作)。用紫外分光光度计测其浓度及含量并以质量分数 1.5% 琼脂糖电泳鉴定其完整性, -70°C 保存待 RT-PCR 测定。

1.2.3 RT-PCR 检测 *c-sis* mRNA RT-PCR 反应按试剂盒说明进行。反应条件为: 变性 94°C 1 min, 复性 55°C 1 min, 延伸 72°C 1 min, 30 个循环, 最后一个循环延伸 7 min。扩增完毕后, 取 5 μl PCR 产物于质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 70 V 电压, 30~60 min 电泳, β -actin 为内参照, 电泳结果扫入计算机, 经 Bio-Rad 凝胶成像分析系统进行定量分析, 以 β -actin 为内参, 测定 *c-sis* 峰密度值。

1.3 统计学处理

用 SAS 软件进行统计学处理, 所有数值均以 (均数 \pm 标准差) 表示, 均数之间的比较应用方差分

析, $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性。

2 结果

2.1 两组巨噬细胞中 *c-sis* mRNA 表达情况

由电泳图 (图 1) 清晰可见 28s 和 18s 条带, 比例约为 2:1, 测得结果 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值在 1.8~2.0 之间, 说明 RNA 提取时未降解, 纯度可用于实验。

AM_s 和 AM_c 经孵育不同时间后提取总 RNA 进行 RT-PCR 反应, 其结果见图 2, 显示 β -actin 内参条带扩增均匀, 条带位于 532 bp 处, 于大约 867 bp 处可见扩增的 *c-sis* 单一条带, 条带清晰, 各组条带宽度及亮度均有差异, 以 β -actin 为内参, *c-sis* 峰密度值见表 1, 可见加入 SiO_2 处理的 AM_s 组原癌基因 *c-sis* 早期 (30 min) 即有 mRNA 表达, 并很快于 1 h 达到表达高峰, 以后随着时间的延长表达量逐渐减少, 而不加 SiO_2 的 AM_c 各组早期也有少量的表达, 但于 12 h 后就不再表达。AM_s 各组表达量与同期 AM_c 各组相比差异有显著性。

表 1 SiO_2 对 AM 中 *c-sis* mRNA 表达的峰密度值 ($\bar{x} \pm s$)

时间	n	实验组	对照组
30 min	3	0.54 \pm 0.01	0.26 \pm 0.02
1 h	3	0.68 \pm 0.01	0.40 \pm 0.01
2 h	3	0.56 \pm 0.02	0.30 \pm 0.07
4 h	3	0.41 \pm 0.04	0.25 \pm 0.02
8 h	3	0.30 \pm 0.05	0.15 \pm 0.04
12 h	3	0.20 \pm 0.01	0.00

注: 表达量越高, 电泳条带越宽越亮, 其峰密度值越大。两组间同期相比 $P < 0.01$, 两组组内 $P < 0.05$

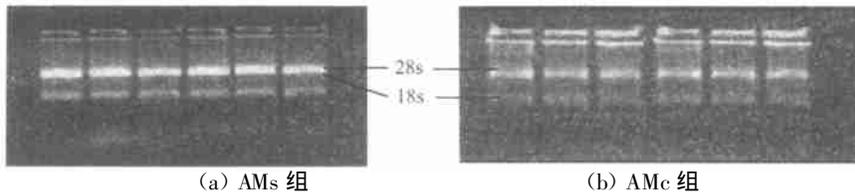
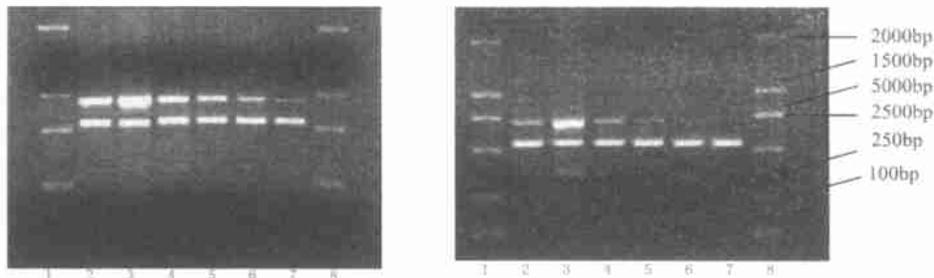


图 1 AM_s 组、AM_c 组总 RNA 电泳图谱



1、8: PCR marker; 2: S₁ (加入 SiO_2 30 min); 3: S₂ (加入 SiO_2 1 h); 4: S₃ (加入 SiO_2 2 h); 5: S₄ (加入 SiO_2 4 h); 6: S₅ (加入 SiO_2 8 h); 7: S₆ (加入 SiO_2 12 h); 1、8: PCR marker; 2: C₁ (加入无血清培养液 30 min); 3: C₂ (加入无血清培养液 1 h); 4: C₃ (加入无血清培养液 2 h); 5: C₄ (加入无血清培养液 4 h); 6: C₅ (加入无血清培养液 8 h); 7: C₆ (加入无血清培养液 12 h)

图 2 AM_s 组、AM_c 组 RT-PCR 电泳图谱

2.2 两组巨噬细胞生理状况的变化情况

实验组巨噬细胞在 SiO₂ 处理后细胞饱满, 体积增大, 胞质丰富, 内含丰富的细小颗粒, 并随时间的延长细胞逐渐皱缩, 失去其饱满的外形, 于 12 h 细胞明显皱缩, 且有许多细胞死亡。对照组巨噬细胞形态欠饱满, 体积较小, 胞质不如实验组丰富, 于 12 h 几乎全部细胞均皱缩死亡, 漂浮于培养液表面。

3 讨论

近年来的研究表明: 肺泡巨噬细胞通过分泌多种细胞因子和炎性介质参与矽肺的形成, 且在矽肺的发病中起中心作用^[7]。这些细胞因子及炎性介质被称为致纤维化因子, 包括: PDGF-A、PDGF-B、TGF、TNF、IL-1、IL-6 等, 在肺脏受矽尘作用后, 这些致纤维化因子分泌量明显增加, 它们之间形成相互作用网络^[8], 共同参与矽肺的形成。另外, 现已证明: PDGF-B 的结构基因即是原癌基因 *c-sis*^[4], Kovac EJ^[9] 在 BLM 致肺纤维化研究中证实, PDGF 占肺泡巨噬细胞源生长因子促细胞分裂活性的 2/3, 因此, PDGF 在矽肺纤维化中起极其重要的作用, 推测作为 PDGF-B 的结构基因 *c-sis* 在矽肺纤维化形成过程中可能存在着高表达。

巨噬细胞可受多种理化因子处理而被激活表达 *c-sis*, Shimokado K, Raines EW 等^[10] 经研究发现: 巨噬细胞的前身——循环中的单核细胞, 正常情况下并不表达 *c-sis* 基因, 但当它们被某种因子(如 BLM、ConA) 激活后, 它们将迅速而短暂地表达 *c-sis* 基因。Antoniades HN^[11] 等通过在体外利用石棉肺大鼠模型研究发现大鼠肺泡巨噬细胞分泌高水平的 PDGF, 同时也对特发性肺纤维化病人及 BLM 诱导的大鼠肺纤维化的肺泡巨噬细胞进行研究, 结果证实巨噬细胞内 PDGF-B mRNA 表达明显增加, 这些均证实 *c-sis* 基因参与了某些因素导致的肺纤维化及慢性炎症过程。

本实验对经 SiO₂ 处理的肺泡巨噬细胞培养不同时间后进行 RT-PCR 检测发现: 巨噬细胞中存在 *c-sis* mRNA 高表达, 实验组及对照组两组均有表达, 并随时间的延长其表达量逐渐减少, 但 SiO₂ 处理的实验组巨噬细胞与对照组相比不仅各时间点的表达量明显高于对照组, 且持续时间也长, 对照组 12 h 后已无表达, 而实验组 12 h 时仍有表达。至于未经 SiO₂ 处理的对照组巨噬细胞之所以也出现 *c-sis* mRNA 高表达, 可能归因于部分巨噬细胞在灌洗和贴壁过程中被活化。Bitterman^[12] 等曾报道: 正常人肺泡巨噬细胞在

贴壁培养过程中即可释放生长因子 PDGF-B 等, 而且当加入巨噬细胞激活处理因子时, 这种释放生长因子作用被大大增强, 且可持续 6~8 d, 这与本实验结果基本一致。本实验虽没有对 SiO₂ 处理的肺泡巨噬细胞 12 h 后进一步检测, 但从其 RT-PCR 结果来看, *c-sis* 的高表达有可能持续一段时间, 尔后其表达量可能会逐渐减少。另外从其细胞形态方面也可以看出经 SiO₂ 处理的实验组巨噬细胞较对照组巨噬细胞分泌功能活跃, 进一步提示 SiO₂ 对巨噬细胞功能具有明显的激活作用。

总之, 本实验结果提示: 在矽肺发病过程中, SiO₂ 通过激活原癌基因 *c-sis*, 合成并分泌 PDGF-B, 进一步促进成纤维细胞增殖而参与矽肺早期的形成。

参考文献:

- [1] Crystal RG, Bitterman PB. Interstitial lung diseases of unknown cause; disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract [J]. N Eng J Med, 1984, 19: 154-166.
- [2] Russell Ross. Peptide regulatory factors [J]. The Lancet, 1989, 27: 1179-1182.
- [3] Muller D. The role of pro-oncogenes in coronary restenosis [J]. Prog in Card Dis, 1997, 40: 117-128.
- [4] Chiu IM, Reddy P, Givol D, et al. Nucleotide sequence analysis identifies the human *c-sis* proto-oncogene as a structural gene for platelet-derived growth factor [J]. Cell, 1984, 37 (1): 123-131.
- [5] 唐其东, 林曙光, 王若洁. *c-sis* 反义寡核苷酸局部干预抑制主动脉损伤后内膜增生 [J]. 中华心血管杂志, 2000, 28 (1): 69-71.
- [6] 赵洪文, 彭璐, 吕长俊. 肺纤维化大鼠 BALF 中的细胞成分与肺组织病理的动态研究 [J]. 中国医科大学学报, 1997, 26: 463-466.
- [7] Marinelli WA. Idiopathic pulmonary fibrosis; progress and challenge [J]. Chest, 1995, 108: 297-198.
- [8] Marinelli WA, Henke CA, et al. Mechanisms of alveolar fibrosis after acute lung injury [J]. Clin Chest Med, 1990, 11: 657-672.
- [9] Kovac EJ, Kelly J. Secretion of macrophage-derived growth factor during acute lung injury induced by bleomycin [J]. J Leuko Biol, 1985, 37: 1-9.
- [10] Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, et al. A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF [J]. Cell, 1985, 43: 277-286.
- [11] Antoniades HN, Bravo MA, Rafael AE, et al. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. J Clin Invest, 1990, 86 (4): 1055-1064.
- [12] Bitterman PB, Rernard SI, Crystal RG, et al. Human alveolar macrophage growth factor for fibroblasts [J]. J Clin Invest, 1982, 70: 806-822.