

甲苯二异氰酸盐对人支气管上皮细胞血管内皮生长因子表达的影响

彭红娟¹, 蔡绍曦¹, 赵海金¹, 李文军², 佟万成¹ (南方医科大学¹ 南方医院呼吸科,² 公共卫生与热带医学学院, 广东 广州 510515)

摘要:目的 探讨甲苯二异氰酸盐(TDI)对正常人支气管上皮细胞(HBE)血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法 应用改良的 Son 氏等方法制备 TDI- 人血清白蛋白(TDI-HSA)。四唑盐(MTT)比色法检测不同浓度的 TDI-HSA 和 HSA 对正常人支气管上皮细胞株 HBE135-E6E7 活力的影响;分别用浓度为 10、20、30、40 $\mu\text{g/ml}$ 的 HSA 和 TDI-HSA 处理 HBE135-E6E7, 以未加任何处理因素的 HBE135-E6E7 为对照组, 用半定量 RT-PCR 同时扩增各组 HBE135-E6E7 VEGF 和 β -actin 基因片段, 从基因水平上比较各组 VEGF 的相对表达情况。结果 40 $\mu\text{g/ml}$ 以下浓度的 HSA 和 TDI-HSA 不影响 HBE135-E6E7 活力;HBE135-E6E7 组成性表达 VEGF189 和 VEGF165;与 10 $\mu\text{g/ml}$ HSA 组以及对照组相比, 10 $\mu\text{g/ml}$ TDI-HSA 组 HBE135-E6E7 VEGF189 和 VEGF165 的表达增加, 但无显著差异($P>0.05$), 20、30、40 $\mu\text{g/ml}$ 的 TDI-HSA 组与相应浓度的 HSA 组以及对照组相比, HBE135-E6E7 VEGF189 和 VEGF165 的表达均显著增加 ($P<0.05$), 且随着 TDI-HSA 浓度的增加, HBE135-E6E7 VEGF189 和 VEGF165 的表达亦随之增加($P<0.05$)。结论 TDI 显著增加 HBE VEGF 表达, 这可能是 TDI 诱发哮喘的发病机制之一。

关键词: 甲苯二异氰酸盐; 哮喘; 血管内皮生长因子; 血清白蛋白; 人支气管上皮细胞

中图分类号: R 562.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4254(2008)02-0209-04

Toluene diisocyanate increases vascular endothelial growth factor expression in human bronchial epithelial cells

PENG Hong-juan¹, CAI Shao-xi¹, ZHAO Hai-jin¹, LI Wen- Jun², TONG Wan-cheng¹

Department of Respiratory Diseases, Nanfang Hospital¹, College of Public Health and Tropical Medicine², Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the effect of toluene diisocyanate (TDI) on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human bronchial epithelial (HBE) cells. **Methods** TDI-human serum albumin (TDI- HSA) conjugate was prepared using a modified Son's method. MTT assay was used to examine the viability of HBE135-E6E7 cells cultured in serum-free medium after treatment with HSA or TDI-HSA at different concentrations. VEGF mRNA expression of the HBE cells treated with HSA or TDI-HSA at 10, 20, 30 and 40 $\mu\text{g/ml}$, respectively, was detected using semi-quantitative RT-PCR. **Results** Treatment with 40 $\mu\text{g/ml}$ HSA and 40 $\mu\text{g/ml}$ TDI-HSA did not result in significant changes in the viability of HBE135-E6E7 cells. RT-PCR revealed the constitutive expression of two VEGF isoforms, namely VEGF189 and VEGF165, in cultured HBE135-E6E7 cells. After exposure to TDI-HSA at the different concentrations (except for 10 $\mu\text{g/ml}$), a significant increase occurred in both VEGF189 and VEGF165 mRNA expressions in HBE135-E6E7 cells as compared with the expressions in the control group and the HSA-treated cells ($P<0.05$), and significant dose dependence was noted in the effect of TDI-HSA ($P<0.05$). No significant difference was found in the expressions between the control cells and the HAS-treated cells ($P>0.05$). **Conclusion** TDI induces significant increase in VEGF expression in HBE cells, and VEGF overexpression may play an important role in the pathogenesis of TDI-induced asthma.

Key words: toluene diisocyanate; asthma; serum albumin; human bronchial epithelial cell; vascular endothelial growth factor

异氰酸盐是引起职业性哮喘最常见的原因, 且诱发的哮喘经常发展为重症哮喘^[1]。在工业中应用最广泛的是甲苯二异氰酸盐(TDI), 暴露 TDI 环境的工人,

约有 5%~15% 发展为哮喘, 而全球普通人群的哮喘发病率为 0.1%~8%, 我国为 0.11%~2.03%。但针对 TDI 哮喘的发病机制研究还比较局限, 很多环节还不是很清楚。最近 Lee 等^[2] 研究表明血管内皮生长因子(VEGF)在 TDI 哮喘扮演关键角色, 但 TDI 是否可直接引起人支气管上皮细胞(HBE) VEGF 表达增加, 并进而发挥其促炎及引起气道高反应性的作用, 尚不清楚。为此, 我们首先在体外建立 TDI 刺激 HBE 的研究模型, 并从基因表达水平观察 TDI 对 VEGF 的表达产生的影响, 试图为研究 TDI 哮喘的发病机制提

收稿日期: 2005-10-25

基金项目: 广东省科技计划 (2005207007) Supported by the Scientific and Technological Research Projects of Guangdong Province (2005207007)

作者简介: 彭红娟(1981-), 女, 在读硕士研究生, 电话: 13632419674, E-mail: lisiyiabc@tom.com

通讯作者: 蔡绍曦, 电话: 020-61641571, E-mail: hxkc@fimmu.com

供线索。

1 材料与方法

1.1 TDI-HSA 的制备

按照文献 [3] 提供的方法稍加改良,200 μl 的 TDI (2,4 TDI:80%,2,6 TDI:20%,购自天津市第一化学试剂厂) 加入到 9 ml 含 1% HSA 的 PBS 溶液里,常温下均匀不断地搅拌,反应 25 min 后,加入碳酸胺 (2 mol/L) 以终止反应,4 $^{\circ}\text{C}$ 3000 g 离心 50 min,以除去未反应的 TDI,离心后取上清至透析袋,在含 0.1 mol/L 碳酸胺透析液透析 3 d,每 8 h 换一次透析液。等量的 20% 三氯醋酸沉淀透析袋内液体,之后用等量 1 mol/L NaOH 溶解沉淀,用 2 L 去离子水透析 1 d,每 4 h 换一次去离子水。TDI-HSA 中 TDI 浓度用的改进的 Gutmann assay 检测,HSA 浓度用 LOWRY 法检测。

1.2 正常人支气管上皮细胞株 HBE135-E6E7 培养

HBE135-E6E7 (美国 ATCC,CRL-2741TM) 用含 15% 的胎牛血清 (杭州四季青),100 U/ml 青霉素,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的链霉素的 RPMI 1640 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养,完全融合后,3~4 d 传一代。当细胞完全融合后,按 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度传至 6 孔板、24 孔板、96 孔板,继续培养,90% 融合后换成角质化无血清培养基。

1.3 四唑盐 (methyltetrazolium,MTT) 比色法检测细胞活力

传至 96 孔板的 HBE135-E6E7,加入不同浓度 (20、40、60、80、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) HSA 和 TDI-HSA 的,同时以未加任何处理因素的 HBE 作为对照组,每个浓度设 7~8 个复孔。培养 48 h 后,每孔加入浓度为 5 mg/ml 的 20 μl MTT,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内孵育 4 h,弃培养液,加入 150 μl DMSO 振荡仪振荡至晶体颗粒溶解,在酶标仪上测定 490 nm 的吸光度值(A 值)。

1.4 HBE135-E6E7 总 RNA 提取

传至 6 孔板的细胞,用不同浓度 (10、20、30、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) HSA 或 TDI-HSA 刺激 HBE135-E6E7 12 h,同时以不加任何处理因素的 HBE135-E6E7 作为对照组孵育 12 h,然后用 Trizol 裂解液裂解,加入氯仿后低温离心取上清,加异丙醇和 75% 的乙醇,均低温离心,用 DEPC 水溶解 RNA,核酸蛋白仪测定总 RNA 浓度和纯度。

1.5 半定量 RT-PCR 扩增 VEGF 和 β -actin 基因

VEGF 的上下游引物分别是 5'-TTGCTGCTCTA CCTCCAC-3' 和 5'-AAATGCTTTCTCCGCTCT-3',内参 β -actin 上下游引物分别是 5'-GTGGACATCCG CAAAGAC-3' 以及 5'-GAAAGGGTGTAAACGCAAC T-3',VEGF 引物可扩增四个不同的亚型 VEGF165

(419 bp),VEGF189 (467 bp),VEGF120 (517 bp),VEGF206 (567 bp)。 β -actin 扩增的产物 300 bp,应用 Takara 公司的一步法试剂盒步扩增 VEGF 和内参 B-actin 基因,扩增时取 0.8 μg 的总 RNA 和 0.4 pmol/ μl 的 VEGF 和 β -actin 上下游引物分管扩增,扩增条件:逆转录为 50 $^{\circ}\text{C}$ 45 min,变性为 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,退火为 57.2 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,30 个循环,产物取 5 μl 于 1.8% 琼脂糖凝胶电泳,DOC GEL 2000 凝胶成像系统分析。

1.6 统计学分析

实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS11.5 统计软件进行 One-way ANOVA (单变量方差) 统计分析,组间多重比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 MTT 比色法检测不同浓度 HSA 和 TDI-HSA 对细胞活力的影响

测得 TDI 浓度为 26.675 $\mu\text{g}/\text{ml}$,HSA 浓度为 2063 $\mu\text{g}/\text{ml}$,TDI 与 HSA 的摩尔比为 4.03。细胞活力=(加药组 A 值-不加细胞组 A 值)/(不加药对照组 A 值-不加细胞组 A 值) $\times 100\%$ 表示。如图 1 和图 2 所示,20 和 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HSA 对 HBE 的细胞活力没有影响,而 60、80、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HSA 增加细胞活力,20、40、60、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TDI-HSA 对细胞活力无明显影响,而 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TDI-HSA 降低细胞活力(图 1 和图 2)。所以本实验选择 10、20、30、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 HSA 和 TDI-HSA 浓度来刺激细胞。

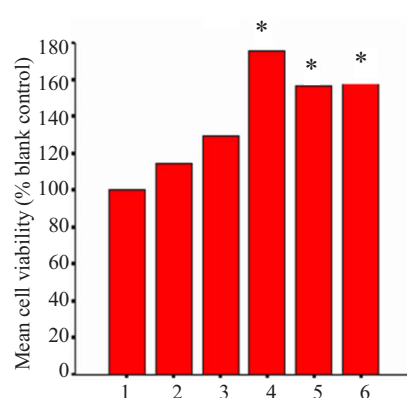


图 1 MTT 所测不同 HSA 浓度对 HBE135-E6E7 活力的影响

Fig.1 Effect of HSA on the viability of HBE135-E6E7 cells assessed using MTT assay

1: Control; 2-6: 20, 40, 60, 80 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HAS, respectively

Mean $\pm$ SD, n=8, * $P < 0.05$ vs control

2.2 半定量 RT-PCR 检测 VEGF 基因表达情况

HBE135-E6E7 组成性表达 VEGF189 (467 bp)、

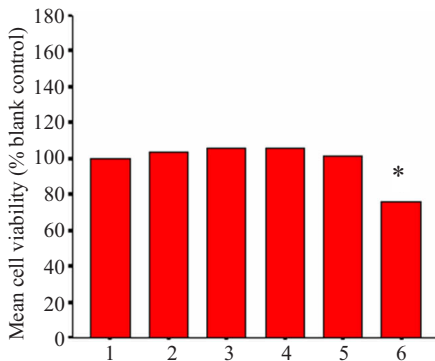


图 2 MTT 所测不同 TDI-HSA 浓度对 HBE135-E6E7 活力的影响

Fig.2 Effect of TDI-HSA on the viability of HBE135-E6E7 at different concentrations

1: Control; 2-6: 20, 40, 60, 80 and 100 $\mu\text{g/ml}$ TDI-HAS, respectively
 $\text{Mean} \pm \text{SD}$, $n=7$, * $P<0.05$ vs control

VEGF165 (419 bp) 亚型基因, 以 VEGF165 表达量较多。HBE135-E6E7 VEGF189 和 VEGF165 在不同浓度 HSA 组之间表达无显著差异 ($P>0.05$), 各浓度 HSA 组与对照组比较亦无显著差别 ($P>0.05$); 与 10 $\mu\text{g/ml}$ HSA 组和对照组相比, 10 $\mu\text{g/ml}$ TDI-HSA 组 HBE135-E6E7 VEGF189 和 VEGF165 的表达增加, 但无显著差异 ($P>0.05$), 20、30、40 $\mu\text{g/ml}$ 的 TDI-HSA 组与相应浓度的 HSA 组以及对照组相比, HBE135-E6E7 VEGF189 和 VEGF165 的表达显著增加 ($P<0.05$), 且随着 TDI-HSA 浓度的增加, HBE135-E6E7 VEGF189 和 VEGF165 的表达亦随之增加 ($P<0.05$) (图 3、4、5)。

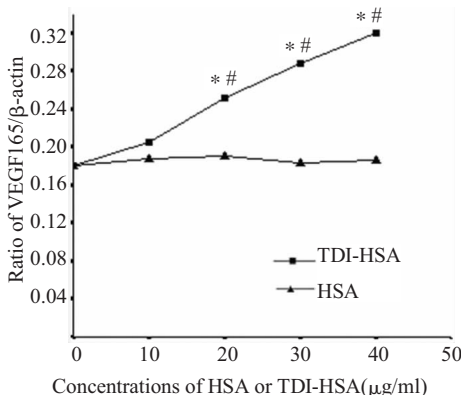


图 3 不同 TDI-HSA 浓度对 HBE135-E6E7 VEGF189 表达的影响

Fig.3 Effect of TDI-HSA on the expression of VEGF189 mRNA expression in HBE135-E6E7 cells

$\text{Mean} \pm \text{SD}$, $n=4$, * $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs the corresponding HSA group

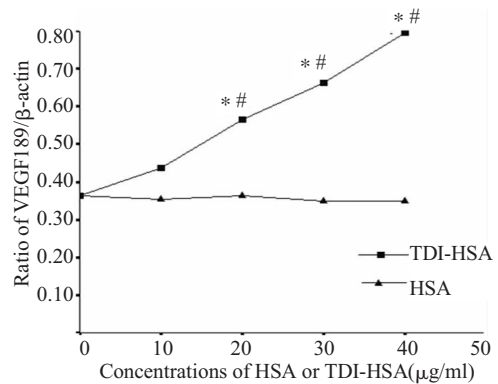


图 4 不同 TDI-HSA 浓度对 HBE135-E6E7 VEGF165 表达的影响

Fig.4 Effect of TDI-HSA on the expression of VEGF165 in HBE135-E6E7 cells

$\text{Mean} \pm \text{SD}$, $n=4$, * $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs the corresponding HSA group

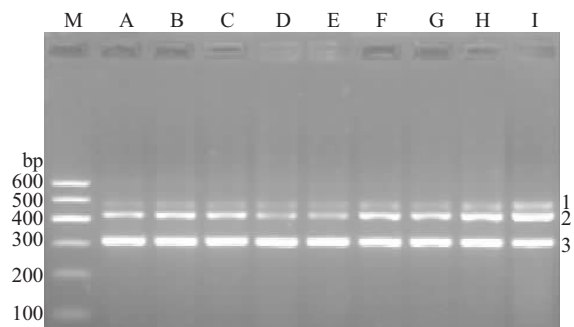


图 5 不同 TDI-HSA 浓度处理的 HBE135-E6E7 VEGF 的 RT-PCR 扩增电泳图

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR product of VEGF from TDI-HAS-treated HBE135-E6E7 cells

M: DNA maker; A: Control; B-E: 10, 20, 30 and 40 $\mu\text{g/ml}$ HAS, respectively; F-I: 10, 20, 30 and 40 $\mu\text{g/ml}$ TDI-HAS, respectively;
 1: VEGF189; 2: VEGF165; 3: β -actin

3 讨论

2002 年 Lee 等^[2]在 TDI 小鼠哮喘模型研究证实 VEGF 水平与气道炎症和气道高反应性明显相关, 使用 VEGF 受体抑制剂后几乎完全逆转其哮喘症状和病理改变; 有研究报道 HBE 是 VEGF 最重要的来源^[4]; 这些研究提示 HBE 来源的 VEGF 可能在 TDI 哮喘中发挥非常重要的作用。但 TDI 是否对 HBE 的 VEGF 表达产生影响尚未见报道。因此本研究主要在体外观察 TDI-HSA 对 HBE VEGF 表达的影响。

由于 TDI 不溶于水, 为建立 TDI 刺激 HBE 模型, 首先需要制作溶于水的 TDI 形式。既往研究表明, 在 TDI 哮喘患者肺泡灌洗液里, 早期即可发现 TDI-HSA 增高, 所占比例最多^[5]; 而且 TDI-HSA 在体

外可刺激 HBE 和 T 淋巴细胞、单核巨噬细胞表达 IL-1、IL-6、IL-4、TNF- α 、GM-CSF 等多种细胞因子^[6-8]。因此本实验首先参照文献并经适当改良制备了 TDI-HSA,用以体外刺激 HBE。但是既往文献报道各种刺激浓度不一,而在法定范围内,TDI 对气道上皮细胞无损伤和毒性作用。所以我们先用 MTT 法检测不同浓度的 HSA 和 TDI-HSA 对 HBE 活力的影响,随后以不影响细胞活力的不同浓度的 HSA 和 TDI-HSA 刺激 HBE,半定量 RT-PCR 检测 VEGF 表达。本实验发现在不影响细胞活力的浓度范围内,TDI-HSA 明显增加 HBE135-E6E7 VEGF 的表达,而且有浓度依赖性,各浓度 HSA 对 VEGF 表达无明显影响,提示 TDI-HSA 对 VEGF 的表达的增加是由 TDI 引起的。但引起其增加的机制目前尚不明了。有研究表明,IL-1、IL-6、TNF- α 可明显上调 HBE VEGF 表达^[4],而 TDI 可以上调这些细胞因子的表达,提示 TDI 可能通过间接途径诱导的 HBE VEGF 的升高。

气道上皮细胞表达 VEGF 的亚型报道不一。多数情况下,VEGF165 的表达占优势,是发挥生物学效应的主要成分,因此研究 VEGF 多以 VEGF165 为主,VEGF-A189 和 VEGF-A206 介导和放大游离的 VEGF165 的病理作用。本实验发现,HBE135-E6E7 分别表达 VEGF189、VEGF165 两亚型,表达丰度更高的是 VEGF165,而且相对于对照组,VEGF165、VEGF189 两亚型在 TDI-HSA 刺激组均显著增加。

有关 TDI 诱导 HBE VEGF 增高的病理意义尚不能确定。这可能通过增加变应原的致敏作用、Th2 细胞介导的炎症、免疫调节^[9];引起 HBE 通透性的增加从而导致抗原物质容易渗透到粘膜下组织^[10];其渗透到血管内皮细胞里,导致血管内皮细胞通透性增加,促进粘膜的水肿、气道高反应性、气道重建的发生^[9]。VEGF 持续高表达可能导致 TDI 哮喘患者的气道炎症持续存在和气道重构,这可能是 TDI 哮喘预后差,肺功能降低比较明显的原因^[11]。上述也提示 VEGF 抑制剂可能是 TDI 哮喘的一个比较好的治疗策略。

总之,本实验成功建立 TDI 刺激 HBE 实验研究模型,并首次从基因水平上证明了 TDI 可直接诱导 HBE VEGF 的表达增加,提示 HBE 来源的 VEGF 可能是 TDI 诱发哮喘的发病机制之一,值得深入探讨。

参考文献:

- [1] Moual N, Siroux V, Pin I, et al. Asthma severity and exposure to occupational asthrogens[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172(4): 440-5.
- [2] Lee YC, Kwak YG, Song CH, et al. Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma[J]. *J Immunol*, 2002, 168(7): 3595-600.
- [3] Modesto RR, Pesce AJ. Use of tolyl diisocyanate for the preparation of a peroxidase-labelled antibody conjugate. Quantitation of the amount of diisocyanate bound[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1973, 295(1): 283-95.
- [4] Sandrine B, Sadia E, Andre C, et al. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279(2): 371-8.
- [5] Wisniewski AV, Srivastava R, Herick C, et al. Identification of human lung and skin proteins conjugated with hexamethylene diisocyanate *in vitro* and *in vivo* [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162(6): 2330-6.
- [6] Lee YM, Kim HA, Park HS, et al. Exposure to toluene diisocyanate (TDI) induces IL-8 production from bronchial epithelial cells: effect of pro-inflammatory cytokines [J]. *J Korean Med Sci*, 2003, 18: 809-12.
- [7] Hirohisa O, Yoichi N, Shizuka I, et al. Toluene diisocyanate (TDI) induces production of inflammatory cytokines and chemokines by bronchial epithelial cells via the epidermal growth factor receptor and p38 mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *Exp Lung Res*, 2006, 32(6): 245-62.
- [8] Lee M, Park S, Park HS, et al. Cytokine secretion patterns of T cells responding to haptenized-human serum albumin in toluene diisocyanate (TDI)-induced asthma patients [J]. *J Korean Med Sci*, 1998, 13(5): 459-65.
- [9] Lee CG, Link H, Peter B, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung [J]. *Nat Med*, 2004, 10(10): 1095-103.
- [10] Ajay B, Antony, Kamal A, et al. Cockroach extract antigen increases bronchial airway epithelial permeability [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 110(4): 589-95.
- [11] Pirila PL, Nordman H, Keskinen HM, et al. Long-term follow-up of hexamethylene diisocyanate-diphenylmethane diisocyanate-, and toluene diisocyanate induced asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162(2): 516-22.

(责任编辑:吴锦雅)