

论著·实验研究

呼吸道合胞病毒感染对气道上皮细胞表皮生长因子受体、紧密连接相关蛋白及黏蛋白表达的影响

刘娟娟¹ 张婷² 米芋枚¹

(浙江大学医学院附属儿童医院 1. 感染病科; 2. 临床营养科, 浙江 杭州 310052)

[摘要] **目的** 探讨呼吸道合胞病毒(RSV)感染气道上皮细胞后对表皮生长因子受体(EGFR)、紧密连接相关蛋白 occludin 及 E-cadherin、黏蛋白 MUC5AC 表达的影响,并探讨可能的机制。**方法** 体外实验分两组,以人气道黏液上皮细胞 NCI-H292 细胞为研究对象,紫外线下灭活的 RSV 加入 NCI-H292 细胞培养基中作为对照组,迅速解冻的 RSV 感染 NCI-H292 细胞为 RSV 感染组。48 h 后通过 Western blot 法检测 occludin、E-cadherin、磷酸化 EGFR (p-EGFR) 及 EGFR 的蛋白表达水平;采用细胞免疫荧光技术观察两组细胞 occludin、E-cadherin 的分布及表达;采用 RT-PCR 法检测两组 MUC5AC mRNA 的表达。**结果** RSV 感染组 occludin、E-cadherin 的蛋白表达水平较对照组下降 ($P<0.05$)。RSV 感染组 p-EGFR 及 EGFR 蛋白的表达水平较对照组升高 ($P<0.05$)。RSV 感染组 MUC5AC mRNA 表达水平较对照组增加 ($P<0.05$)。**结论** RSV 可破坏气道上皮细胞间的紧密连接,促进黏蛋白的分泌,影响气道的屏障功能。EGFR 的磷酸化在上述过程中起重要作用。

[中国当代儿科杂志, 2019, 21(3): 294-299]

[关键词] 呼吸道合胞病毒; 表皮生长因子受体; 紧密连接相关蛋白; 黏蛋白; 气道上皮细胞

Effects of respiratory syncytial virus infection on epidermal growth factor receptor, tight junction association proteins and mucin in airway epithelial cells

LIU Juan-Juan, ZHANG Ting, MI Yu-Mei. Department of Infectious Diseases, Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310052, China (Email: 6512035@zju.edu.cn)

Abstract: Objective To study the effects of respiratory syncytial virus (RSV) infection on epidermal growth factor receptor (EGFR), tight junction association proteins and mucin in the human airway epithelial cells. **Methods** Human airway epithelial cells NCI-H292 were randomly treated by ultraviolet light-inactivated RSV (control group) or thawed RSV (RSV infection group). After 48 hours of treatment, the protein levels of occludin, E-cadherin, phosphorylated EGFR and EGFR in NCI-H292 cells were measured by Western blot. The distribution and expression levels of occludin and E-cadherin in NCI-H292 cells were examined by immunofluorescence technique. The expression levels of MUC5AC mRNA in NCI-H292 cells were assessed by RT-PCR. **Results** The protein levels of occludin and E-cadherin were significantly reduced in the RSV infection group compared with the control group ($P<0.05$). The protein levels of phosphorylated EGFR and EGFR increased significantly in the RSV infection group compared with the control group ($P<0.05$). The MUC5AC mRNA levels also increased significantly in the RSV infection group compared with the control group ($P<0.05$). **Conclusions** RSV may down-regulate the tight junction association proteins and up-regulate the expression of MUC5AC in airway epithelial cells, which contributes to epithelial barrier dysfunction. EGFR phosphorylation may play an important role in regulation of airway barrier.

[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(3): 294-299]

Key words: Respiratory syncytial virus; Epidermal growth factor receptor; Tight junction association protein; Mucin; Airway epithelial cell

气道上皮细胞间的顶端连接复合物与其表面的黏液层构成了抵御病原微生物入侵的屏障。顶端连接复合物由紧密连接与黏附连接组成,在调控细胞周围的通透性及维持细胞的极化上起重要作用^[1]。紧密连接是跨膜蛋白(如 occludin、claudins)和胞质蛋白(如 ZO-1/2、cingulin)组成^[2]。参与黏附连接的主要有上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、 β -连环蛋白(β -catenin)及 α -连环蛋白(α -catenin)^[1]。气道黏液层的重要组分为黏蛋白 MUC5AC^[3]。哮喘、肺囊性纤维病等疾病状态时,气道上皮细胞均受累。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)可参与上皮细胞的生长、修复和瘤变,在黏蛋白的分泌、细胞间紧密连接的调控中起重要作用^[3-6]。

病毒可影响气道的紧密连接,如腺病毒感染上皮细胞后产生纤维蛋白,破坏细胞间的黏附,实现病毒逃逸^[7];人鼻病毒可改变气道上皮细胞紧密连接蛋白的表达,致细胞屏障功能受损^[8]。呼吸道合胞病毒(RSV)感染是五岁以下儿童发病和死亡的主要原因之一^[9],目前 RSV 对气道紧密连接的影响仍不明确。气道上皮细胞是 RSV 最主要的靶细胞。RSV 附于气道上皮细胞后可启动固有免疫反应,进而诱发病理改变^[10]。研究显示 EGFR 的活化可抑制气道上皮细胞的抗病毒防御功能^[11]。因此,明确 RSV 对 EGFR 的影响可为机体增强病毒防御能力、降低病毒感染提供可能的方法。

基于上述背景,本实验将探讨 RSV 感染气道上皮细胞后对 EGFR、紧密连接相关蛋白(occludin、E-cadherin)、MUC5AC 表达的影响并探讨可能的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

NCI-H292 细胞株(武汉博士德生物工程有限公司);RSV 病毒 Long 株(美国模式培养物保藏所);Alexa Fluor 488 标记二抗(美国 BioLegend 公司);occludin 抗体、E-cadherin 抗体、EGFR 抗体、p-EGFR 抗体、GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记二抗(北京博奥森生物技术有限公司);ECL 化学发光液(北京康为世纪生物技术有限公司);RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);

高纯总 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)、RT-PCR Kit(北京百泰克生物技术有限公司);RPMI 培养基 1640、胎牛血清(美国 Gibco 公司)。全自动激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司);Step-one PCR 仪(美国 ABI 公司);G:BOX 型凝胶成像系统(英国 Syngene 公司)。

1.2 NCI-H292 细胞培养及分组

NCI-H292 细胞培养于 RPMI1640 培养基,其中含 10% 胎牛血清及终浓度为 100 U/mL 的青霉素和 100 mg/L 的链霉素。将 NCI-H292 细胞接种于六孔板,细胞密度为 1.2×10^6 /mL,培养体积 3 mL。当细胞于 5%CO₂、95% 湿度、37℃ 的培养箱中生长至 70%,分为对照组及 RSV 感染组。对照组:弃上清,加入 3 mL 不含双抗及胎牛血清的 RPMI1640 培养液,再加入紫外灭活的 RSV;感染组:弃上清,加入 500 μ L 不含双抗及胎牛血清的培养基,再加入迅速解冻的 5 μ L RSV(感染复数=1.0)。每 30 min 摇晃六孔板 1 次,2 h 后加 2.5 mL 不含双抗及胎牛血清的培养基。孵育 48 h 后收集细胞进行实验。

1.3 免疫荧光技术检测 occludin、E-cadherin 表达

在六孔板内提前放入灭菌处理的盖玻片,用上述方法培养及感染 NCI-H292 细胞,每组制作 3 张细胞爬片。48 h 后,PBS 室温环境下冲洗细胞并弃去 PBS,加入 4% 多聚甲醛(PFA)固定细胞 10 min,PBS 冲洗 3 次。加入 1%BSA 室温封闭 60 min,PBS 冲洗 5 min。分别加入 E-cadherin(1:100)、occludin(1:100)一抗,4℃ 孵育过夜,PBS 冲洗 3 次,加入 Alexa Fluor 488 标记的二抗(1:500),避光 1 h,PBS 冲洗 3 次,晾干封片。在全自动激光共聚焦显微镜下观察。细胞免疫荧光图像用 Image J 软件分析,结果用平均免疫荧光强度表示。实验独立重复 3 次。

1.4 蛋白免疫印迹检测 occludin、E-cadherin、EGFR、p-EGFR 的表达

按每孔加入 150 μ L 裂解液的比例提取总蛋白,冰上裂解处理 30 min,收集裂解液,4℃、12000 r/min 离心 5 min,取上清。BCA 法测蛋白浓度。取 40 μ g 总蛋白与 2 \times SDS-Loading buffer 混合,95℃ 变性 5 min 后上样,10% SDS-PAGE 凝胶电泳 70 min,半干式转膜至 PVDF 膜(25 V,30 min),5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,分别加入

E-cadherin (1:200)、occludin (1:200)、EGFR (1:500)、p-EGFR (1:200)、GAPDH (1:1000) 一抗, 4℃孵育过夜, TBST洗膜3次, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:50000), 室温平稳摇动1 h, TBST洗膜3次, ECL显色, G:BOX型凝胶成像系统进行扫描。成像的蛋白条带经 Image J 软件分析灰度值, 结果以目的蛋白与内参蛋白 GAPDH 灰度值的比值表示蛋白相对表达量。实验独立重复3次。

1.5 RT-PCR 法检测 MUC5AC 表达

依据试剂盒方法提取总 RNA, 并据试剂盒反应体系及条件进行反转录, 测 cDNA 的浓度。采用 Primer3.0 软件设计引物并由上海赛百盛基因技术有限公司合成。MUC5AC 上游引物序列: 5'-TGATCATCCAGCAGCAGGGCT-3', 下游引物序列: 5'-CCGGCTCAGAGGACATATGGG-3', 片段长度 409 bp; 内参 GAPDH 上游引物序列: 5'-AGGTCGGAGTCAACGGATTTG-3', 下游引物序列: 5'-GTGATGGCATGGACTGTGGT-3', 片段长度 532 bp。反应体系 (25 μL): 10×PCR buffer 2.5 μL, dNTP 2 μL, Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, 模板 DNA 5 μL, 上、下游引物各 1 μL, ddH₂O 13.3 μL。反应条件: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 45 s, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。采用 3% 琼脂糖凝胶电泳, 应用 UVP 凝胶成像系统记录结果。图像经 Image J 软件分析灰度值, 结果用

MUC5AC 与 GAPDH 灰度值的比值表示 mRNA 相对表达量。实验独立重复3次。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计分析。计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用两独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 occludin 及 E-cadherin 蛋白表达的变化

RSV 感染 NCI-H292 细胞 48 h, occludin、E-cadherin 在蛋白水平的表达减少, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。通过免疫荧光技术观察两组细胞, RSV 感染组 occludin、E-cadherin 的荧光强度较对照组下降 ($P < 0.01$), 同时 RSV 感染组细胞形态发生改变 (图 2)。

2.2 两组 p-EGFR 及 EGFR 蛋白表达的变化

RSV 感染 NCI-H292 细胞 48 h, EGFR 磷酸化水平及 EGFR 的蛋白表达水平均较对照组增高 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.3 两组 MUC5AC mRNA 的表达变化

RSV 感染 NCI-H292 细胞 48 h, MUC5AC mRNA 的相对表达量高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4。

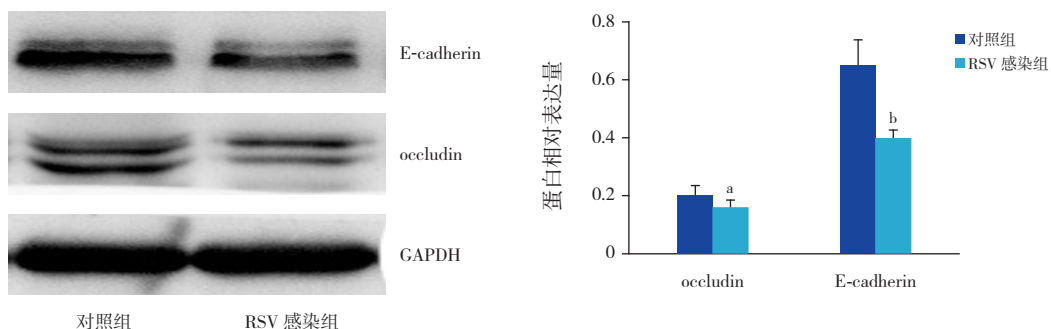


图 1 Western blot 法检测两组 occludin 及 E-cadherin 的蛋白表达变化 左图为蛋白电泳条带图。右图为两组目的蛋白表达统计图 ($n=3$), a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与对照组比较, $P < 0.01$ 。

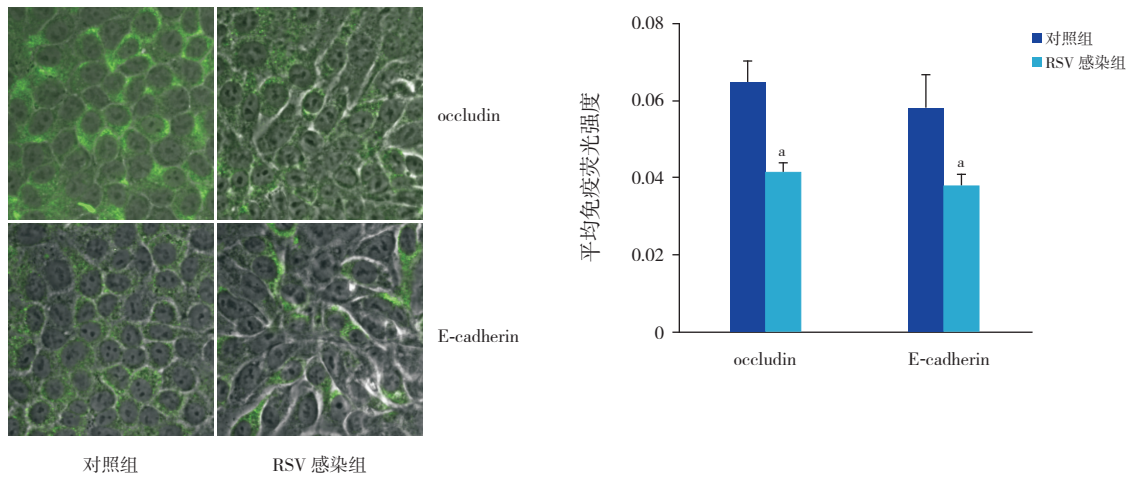


图2 免疫荧光染色法检测 RSV 感染 NCI-H292 细胞 48 h 后 occludin 及 E-cadherin 的表达变化 (×300) 左图为细胞免疫荧光图, 绿色荧光为目的蛋白的阳性表达; RSV 感染组 occludin 及 E-cadherin 的阳性表达均弱于对照组。右图为两组目的蛋白平均荧光强度统计图 (n=3), a 示与对照组比较, P<0.01。

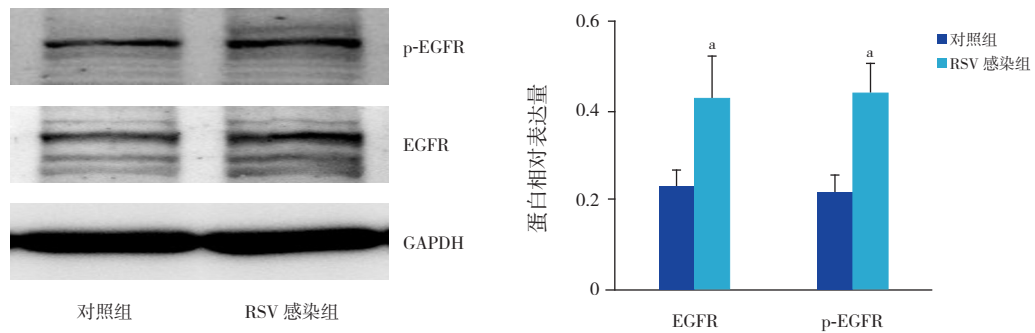


图3 Western blot 法检测两组 p-EGFR 及 EGFR 蛋白的表达变化 左图为蛋白电泳条带图; 右图为两组的蛋白表达统计图 (n=3), a 示与对照组比较, P<0.05。

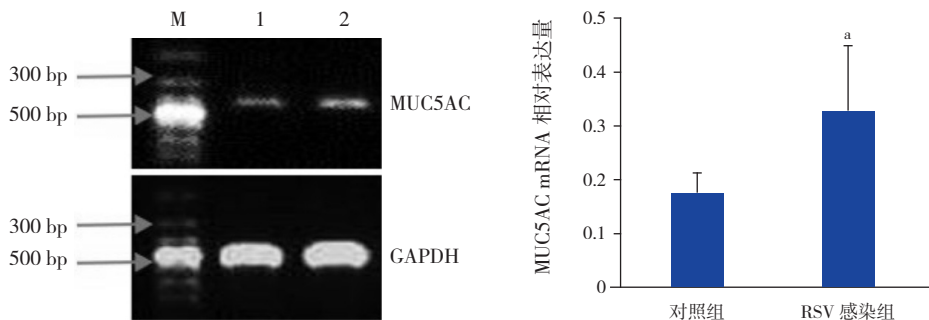


图4 RT-PCR 法检测两组 MUC5AC mRNA 的表达 左图为 PCR 扩增产物的凝胶电泳图, M: Marker, 1: 对照组, 2: RSV 感染组; 右图为 MUC5AC mRNA 相对表达量统计图 (n=3), a 示与对照组比较, P<0.05。

3 讨论

RSV 感染组 EGFR 的磷酸化水平明显增加, 提示 RSV 可致 EGFR 活化。EGFR 定位于细胞膜基底外侧, 其胞内区有酪氨酸激酶活性, 当配体与 EGFR 结合导致受体自身的酪氨酸残基磷酸化,

可募集相关信号转运蛋白, 激活下游信号通路。RSV 介导的 EGFR 活化可导致下游 ERK 活性增加, 促进 IL-8 释放并抑制 RSV 感染细胞的凋亡^[12]; 可抑制干扰素调节因子 1 依赖性干扰素-λ 的产生, 增加 RSV 的感染滴度, 而抑制 EGFR 活化能降低病毒的感染滴度^[13]。上述发现提示抑制 EGFR 的

活化是降低 RSV 感染程度的方法。

EGFR 的胞外区与 E-cadherin 连接。E-cadherin 是广泛分布于上皮细胞表面的跨膜糖蛋白。在胞内, E-cadherin 与 β -catenin、 α -catenin 形成连接复合物, 连接肌动蛋白、细胞骨架蛋白, 促进细胞间的黏附^[14]。实验中 RSV 感染上皮细胞后促进 EGFR 磷酸化, 而 β -catenin 是 EGFR 磷酸化后的作用底物。因此, 当 EGFR 磷酸化后 E-cadherin/ β -catenin 连接复合物解体, E-cadherin 相关的细胞间屏障功能受损^[15]。随着紧密连接的受损, E-cadherin/EGFR 胞外段的连接受损, EGFR 可易位至胞膜顶端, 此时更易与配体结合、活化, 进一步破坏紧密连接^[1]。利用 siRNA 沉默 E-cadherin 后, 引起 EGFR 的磷酸化增加, 其下游 MEK/ERK-1/2 和 p38 MAPK 通路激活, 导致 Th2 型炎症反应趋化因子表达增加, 同时 E-cadherin 参与的细胞间连接减弱^[16]。体内实验显示, 小鼠支气管上皮细胞 E-cadherin 表达缺失时, 紧密连接蛋白 occludin、ZO-1 及 claudins 发生易位^[17]。因此可推断, RSV 感染气道上皮细胞后下调 E-cadherin 的表达, 致紧密连接相关蛋白易位, 导致气道黏膜屏障功能受损。EGFR 磷酸化是导致 E-cadherin 介导的屏障功能受损的重要因素。

RSV 感染组 occludin 的蛋白表达水平下调。occludin 是定位于紧密连接部位的跨膜蛋白, 它的羧基末端通过 ZO-1/2 与细胞骨架蛋白结合, 维持细胞间的黏附^[18]。研究显示, 机械性肺损伤、镉、甲醛暴露等理化因素刺激时, 气道上皮细胞的 occludin 下调, 而磷酸化 occludin 上调, PKC 通路激活, 同时影响连接复合物的完整性, 导致屏障功能受损^[19-21]。本实验结果提示除上述理化因素外, RSV 亦可下调 occludin 的表达。Chen 等^[22]证实: EGFR 及下游 p38MAPK/NF- κ B 信号通路的活化, 可致 occludin 在转录水平、蛋白水平的表达均下调, 而加入 EGFR 抑制剂时上述效应减弱。RSV 感染组的 occludin 表达下调伴 EGFR 活化, 可能与 Chen 等^[22]发现的机制相关。

RSV 感染组黏蛋白 MUC5AC 在转录水平的表达上调。实验中 MUC5AC 表达的增高与 EGFR 及下游生长因子信号通路的活化有关^[23]; 另外, 与紧密连接对黏蛋白基因的调控有关。气道上皮细胞间紧密连接受损时可释放 β -catenin, β -catenin 与

LEF1 相互作用后转入核内, 能增强 MUC5AC 启动子的活性^[24]。

综上所述, RSV 感染气道上皮细胞可活化 EGFR, 下调气道上皮细胞紧密连接相关蛋白 E-cadherin、occludin 的表达, 上调黏蛋白 MUC5AC 的表达, 破坏气道黏膜的屏障功能。EGFR 的磷酸化在上述过程中起重要作用。本文还存在不足, EGFR 相关信号通路在 RSV 影响气道上皮细胞紧密相关连接蛋白表达中的作用仍需进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Ganesan S, Comstock AT, Sajjan US. Barrier function of airway tract epithelium[J]. *Tissue Barriers*, 2013, 1(4): e24997.
- [2] Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, et al. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occluding[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(27): 20520-20526.
- [3] Bonser LR, Erle DJ. Airway mucus and asthma: the role of MUC5AC and MUC5B[J]. *J Clin Med*, 2017, 6(12): 112.
- [4] Seo GS, Jiang WY, Park PH, et al. Hirsutenone reduces deterioration of tight junction proteins through EGFR/Akt and ERK1/2 pathway both converging to HO-1 induction[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 90(2): 115-125.
- [5] Petecchia L, Sabatini F, Usai C, et al. Cytokines induce tight junction disassembly in airway cells via an EGFR-dependent MAPK/ERK1/2-pathway[J]. *Lab Invest*, 2012, 92(8): 1140-1148.
- [6] Terakado M, Gon Y, Sekiyama A, et al. The Rac1/JNK pathway is critical for EGFR-dependent barrier formation in human airway epithelial cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 300(1): L56-L63.
- [7] Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, et al. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape[J]. *Cell*, 2002, 110(6): 789-799.
- [8] Looi K, Troy NM, Garratt LW, et al. Effect of human rhinovirus infection on airway epithelium tight junction protein disassembly and transepithelial permeability[J]. *Exp Lung Res*, 2016, 42(7): 380-395.
- [9] Mazur NI, Martín-Torres F, Baraldi E, et al. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics[J]. *Lancet Respir Med*, 2015, 3(11): 888-900.
- [10] Farrag MA, Almajhdi FN. Human respiratory syncytial virus: role of innate immunity in clearance and disease progression[J]. *Viral Immunol*, 2016, 29(1): 11-26.
- [11] Ueki IF, Min-Oo G, Kalinowski A, et al. Respiratory virus-induced EGFR activation suppresses IRF1-dependent interferon λ and antiviral defense in airway epithelium[J]. *J Exp Med*, 2013, 210(10): 1929-1936.
- [12] Monick MM, Cameron K, Staber J, et al. Activation of the epidermal growth factor receptor by respiratory syncytial virus

- results in increased inflammation and delayed apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(3): 2147-2158.
- [13] Kalinowski A, Galen BT, Ueki IF, et al. Respiratory syncytial virus activates epidermal growth factor receptor to suppress interferon regulatory factor 1-dependent interferon-lambda and antiviral defense in airway epithelium[J]. *Mucosal Immunol*, 2018, 11(3): 958-967.
- [14] Mehta S, Nijhuis A, Kumagai T, et al. Defects in the adherens junction complex (E-cadherin/ β -catenin) in inflammatory bowel disease[J]. *Cell Tissue Res*, 2015, 360(3): 749-760.
- [15] 邢荣春, 郑军, 刘伟, 等. E-cadherin 在 EGFR 分子靶向治疗中作用的研究进展 [J]. *肝胆胰外科杂志*, 2013, 25(2): 175-177.
- [16] Heijink IH, Kies PM, Kauffman HF, et al. Down-regulation of E-cadherin in human bronchial epithelial cells leads to epidermal growth factor receptor-dependent Th2 cell-promoting activity[J]. *J Immunol*, 2007, 178(12): 7678-7685.
- [17] Tunggal JA, Helfrich I, Schmitz A, et al. E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions[J]. *EMBO J*, 2005, 24(6): 1146-1156.
- [18] Furuse M, Itoh M, Hirase T, et al. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions[J]. *J Cell Biol*, 1994, 127(6): 1617-1626.
- [19] Arican RY, Sahin Z, Ustunel I, et al. Effects of formaldehyde inhalation on the junctional proteins of nasal respiratory mucosa of rats[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2009, 61(4): 297-305.
- [20] Cao X, Lin H, Muskhelishvili L, et al. Tight junction disruption by cadmium in an in vitro human airway tissue model[J]. *Respir Res*, 2015, 16(1): 30.
- [21] Liu M, Gu C, Wang Y. Upregulation of the tight junction protein occludin: effects on ventilation-induced lung injury and mechanisms of action[J]. *BMC Pulm Med*, 2014, 14: 94.
- [22] Chen F, Hori T, Ohashi N, et al. Occludin is regulated by epidermal growth factor receptor activation in brain endothelial cells and brains of mice with acute liver failure[J]. *Hepatology*, 2011, 53(4): 1294-1305.
- [23] Takeyama K, Dabbagh K, Lee HM, et al. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(6): 3081-3086.
- [24] Young HW, Williams OW, Chandra D, et al. Central role of Muc5ac expression in mucous metaplasia and its regulation by conserved 5' elements[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 37(3): 273-290.

(本文编辑: 万静)