

论著·基础研究

胰岛素样生长因子 1 对小鼠肺泡上皮细胞吞噬功能和白细胞介素 10 产生的影响

吴凤娇*, 母迷迷*, 何晶, 马华, 郭术俊, 宋传旺

蚌埠医学院免疫学教研室, 安徽省感染与免疫重点实验室, 蚌埠 233030

[摘要] 目的·探讨胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 对小鼠肺泡上皮细胞株 MLE-12 细胞吞噬功能和白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 产生的影响。方法·体外培养的 MLE-12 细胞, 在有或无磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 抑制剂 wortmannin 存在下用 IGF-1 刺激 48 h; 加入荧光微球孵育 2 h 后, 流式细胞术检测细胞吞噬荧光微球情况。酶联免疫吸附试验检测 IGF-1 刺激 MLE-12 细胞 24 h 后上清液中 IL-10 的含量。IGF-1 预处理 2 h 后, 脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 刺激 MLE-12 细胞 24 h, Western blotting 检测细胞质中磷酸化信号转导与转录激活因子 3 (phosphorylated signal transduction and activator of transcription 3, p-STAT3) 的表达情况。结果·随着 IGF-1 刺激浓度的增加, MLE-12 细胞吞噬荧光微球的能力增强; 在 50 ng/mL 的 IGF-1 的刺激下, MLE-12 细胞吞噬荧光微球的能力达到峰值。wortmannin 阻断 PI3K/蛋白激酶 B (Akt) 途径, IGF-1 促进 MLE-12 细胞吞噬荧光微球的能力消失。IGF-1 促进 MLE-12 细胞分泌 IL-10 并抑制 LPS 诱导的 STAT3 激活。结论·IGF-1 通过 PI3K/Akt 途径促进 MLE-12 细胞的吞噬作用, 并具有一定的抗炎作用。

[关键词] 胰岛素样生长因子 1; MLE-12 细胞; 吞噬功能; 白细胞介素 10; 信号转导与转录激活因子 3

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.03.006 **[中图分类号]** R392 **[文献标志码]** A

Effect of insulin-like growth factor 1 on phagocytosis and production of interleukin-10 in murine alveolar epithelial cells

WU Feng-jiao, MU Mi-mi, HE Jing, MA Hua, GUO Shu-jun, SONG Chuan-wang

Department of Immunology, Anhui Provincial Key Laboratory of Infection and Immunity, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China

[Abstract] Objective·To investigate the effect of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) on phagocytosis and production of interleukin-10 (IL-10) in the murine alveolar epithelial cell line MLE-12. Methods·After treatment with IGF-1 for 48 h, MLE-12 cells were incubated with fluorescent microspheres for 2 h in the presence or absence of wortmannin (phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor). Flow cytometry was then used to assess cell phagocytosis of fluorescent microspheres. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of IL-10 in MLE-12 cells culture supernatant stimulated by IGF-1 for 24 h. After pretreatment with IGF-1 for 2 h, MLE-12 cells were stimulated by lipopolysaccharides (LPS) for 24 h, and the expression of phosphorylated signal transduction and activator of transcription 3 (p-STAT3) in cytoplasm was detected by Western blotting. Results·With the increase of IGF-1 stimulation concentration, the ability of MLE-12 cells to phagocytose fluorescent microspheres increased, and the ability to phagocytose fluorescent microspheres reached the peak in the presence of IGF-1 at 50 ng/mL. However, the ability of IGF-1 to phagocytose fluorescent microspheres was completely blocked by wortmannin in MLE-12 cells. IGF-1 promoted IL-10 secretion and inhibited LPS-induced enhancement of STAT3 activation in MLE-12 cells. Conclusion·IGF-1 promotes phagocytosis of MLE-12 cells via the PI3K/protein kinase B (Akt) pathway and exhibits anti-inflammatory properties.

[Key words] insulin-like growth factor 1 (IGF-1); MLE-12 cell; phagocytosis; interleukin-10 (IL-10); signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3)

胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 是由 70 个氨基酸组成的小分子多肽, 相对分子质量约为 7 500。其与 IGF-2、胰岛素及其相应受体一起构成了胰岛素样生长因子家族。IGF-1 与胰岛素具有 50% 的同源性^[1-2]。

IGF-1 在调控细胞增殖、分化、代谢、存活等方面起关键作用^[3]。IGF-1 在外周主要来源于肝脏, 它的表达被生长激素所调控。IGF-1 也能在肺等其他器官中合成。所有类型的细胞都能对 IGF-1 信号起反应。因此, IGF-1 可以通

[基金项目] 国家自然科学基金 (81273273, 81801573); 安徽省自然科学基金 (1708085MH218, 1808085QH253); 蚌埠医学院自然科学基金重点项目 (BYKY1716ZD) (National Natural Science Foundation of China, 81273273, 81801573; Anhui Provincial Natural Science Foundation, 1708085MH218, 1808085QH253; Natural Science Research Program of Bengbu Medical College, BYKY1716ZD)。

[作者简介] 吴凤娇 (1988—), 女, 讲师, 博士; 电子信箱: 124914924@qq.com。母迷迷 (1991—), 女, 硕士生; 电子信箱: 1620478237@qq.com。* 为共同第一作者。

[通信作者] 宋传旺, 电子信箱: chuanwangsong@163.com。



过内分泌及旁分泌的方式在多个器官产生多种效应，同时其在一些病理状态下也起重要作用^[4-5]。

吞噬活动是种系发育中的古老程序，是免疫应答的基本特征。吞噬被定义为细胞吞噬直径大于0.5 μm颗粒的过程，主要由特化的吞噬细胞来完成。吞噬细胞不但能摄取病原微生物，还能摄取凋亡细胞。因此，吞噬细胞参与了每日成千上万死亡细胞的清除。吞噬细胞对凋亡细胞的清除有利于炎症的解决，保护组织避免暴露于死亡细胞来源的炎性和免疫原性的内容物^[6-7]。专职的吞噬细胞包括单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞等。这些细胞掌管了病原微生物的清除，并将其提呈给适应性免疫系统的细胞。此外，上皮细胞、成纤维细胞、内皮细胞等非专职吞噬细胞也能完成吞噬作用。这类细胞虽然不能吞噬病原微生物，但在清除凋亡细胞方面有重要作用^[8-9]。

IGF-1 对细胞吞噬活动影响的报道相对较少。最近的研究^[10]表明，IGF-1 可以使小鼠专职吞噬的巨噬细胞的吞噬活性增加。但 IGF-1 对肺泡上皮细胞等非专职吞噬细胞的吞噬活性有何影响尚不清楚。本研究以体外培养的小鼠肺泡上皮细胞株 MLE-12 细胞为研究对象，采用 IGF-1 刺激后观察细胞对荧光微球的吞噬情况，并对 MLE-12 细胞分泌白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 和信号转导与转录激活因子 3 (signal transduction and activator of transcription 3, STAT3) 激活情况进行检测。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小鼠肺泡上皮细胞株 MLE-12 细胞购自上海纪宁实业公司；重组的小鼠 IGF-1 购自 Abcam 公司；荧光微球购自美国 Polysciences 公司；小鼠 IL-10 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司；脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) (*Escherichia coli* O26:B6) 购自 Sigma 公司；磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 抑制剂 wortmannin (货号：S1952)、磷酸化 STAT3 (p-STAT3) 抗体 (货号：AF1276)、β-actin 抗体 (货号：AF0003)、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-Akt) 抗体 (货号：AA329) 及化学发光试剂盒 BeyoECL Plus 购自上海碧云天公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的培养

肺泡上皮细胞株 MLE-12 细胞接种在含 10% 胎牛血清和 1% 的青霉素 - 链霉素的 DMEM (高

糖型) 完全培养液中，在 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中培养。待细胞贴壁铺满后，用 0.25% 胰酶消化后，收集细胞，分瓶继续培养，每日或隔日细胞传代 1 次。

1.2.2 MLE-12 细胞吞噬荧光微球的检测 MLE-12 细胞 (5×10^4 /孔) 接种于 24 孔板，待细胞贴壁后，用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗去未贴壁细胞，加入新的完全 DMEM 培养液；用不同浓度 IGF-1 (10、30、50、70、100 ng/mL) 刺激 MLE-12 细胞 48 h 后，每孔加入 1 μL 荧光微球 (4.55×10^7 个微球)，2 h 后收集细胞；用 PBS 洗涤 2 遍后，用 4% 的多聚甲醛固定，FACSCalibur 流式细胞仪检测 MLE-12 细胞吞噬荧光微球情况。结果以吞噬荧光微球的细胞数占总计数细胞的百分比表示。阻断实验中，加入 wortmannin (1 μmol/L) 作用 2 h 后，再加入 IGF-1 刺激 MLE-12 细胞。

1.2.3 ELISA MLE-12 细胞 (5×10^5 /孔) 接种于 24 孔板，用 50 ng/mL 的 IGF-1 刺激 MLE-12 细胞 48 h 后，收集上清液，按照 IL-10 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-10 含量。

1.2.4 Western blotting 取各组 MLE-12 细胞，采用 NP-40 细胞裂解液和苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 按照 100:1 的比例配制细胞裂解液提取蛋白。使用 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离待测蛋白，分离胶浓度 12%；转膜后用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h，用稀释度为 1:500 的 p-STAT3 抗体、p-Akt 抗体和 β-actin 抗体 4℃ 孵育过夜，二抗孵育 2 h，然后采用 BeyoECL Plus 试剂盒进行显色，并用 ImageJ 软件进行积分光密度分析。

1.3 统计学分析

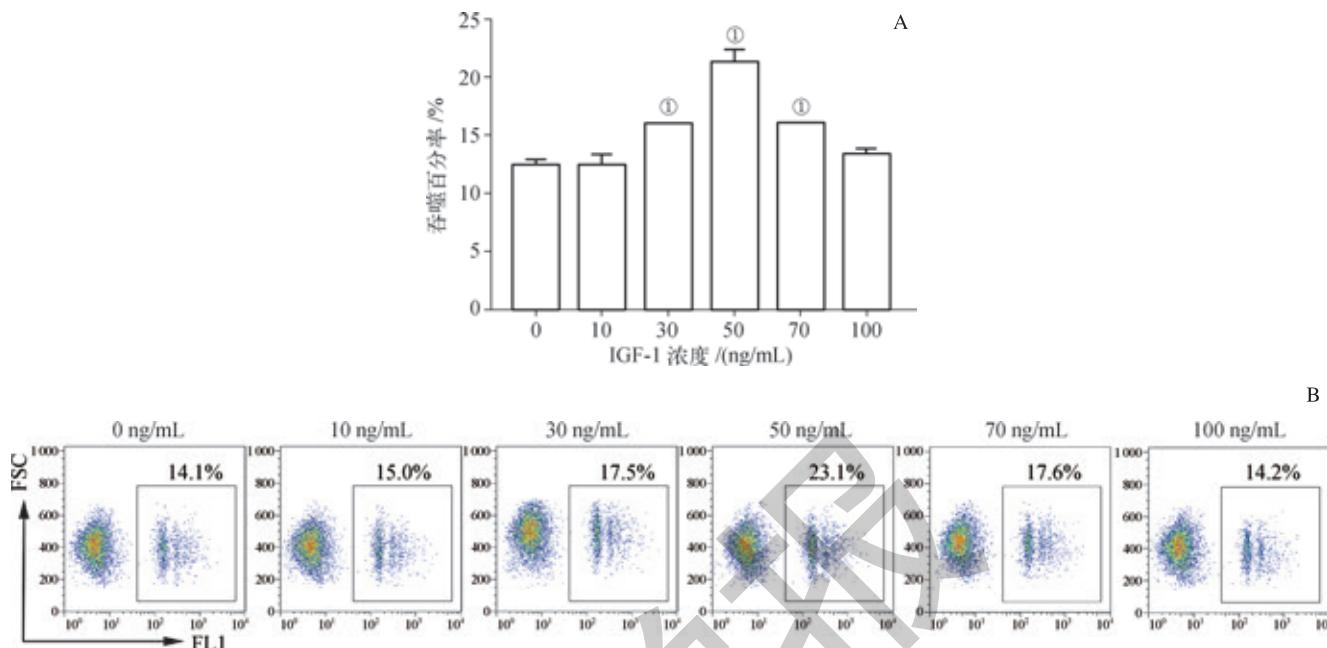
实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 16.0 软件进行数据分析，多组间比较采用方差分析，2 组之间比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IGF-1 促进 MLE-12 细胞的吞噬作用

首先用不同浓度的 IGF-1 刺激肺泡上皮细胞株 MLE-12 细胞，结果发现：30 ng/mL 的 IGF-1 刺激后，MLE-12 细胞吞噬荧光微球的功能开始增强；50 ng/mL 的 IGF-1 对细胞吞噬荧光微球的促进功能达到高峰；100 ng/mL 的 IGF-1 作用下，细胞吞噬荧光微球的能力恢复到对照组水平 (图 1)。这说明 50 ng/mL 的 IGF-1 在促进 MLE-12 细胞的吞噬功能方面的作用最强。在后续的实验中，IGF-1 均采用 50 ng/mL 的刺激浓度。





注: A. 荧光微球吞噬率的统计图; B. 代表性的流式细胞术散点图。^① $P=0.000$, 与 0 ng/mL 组比较。

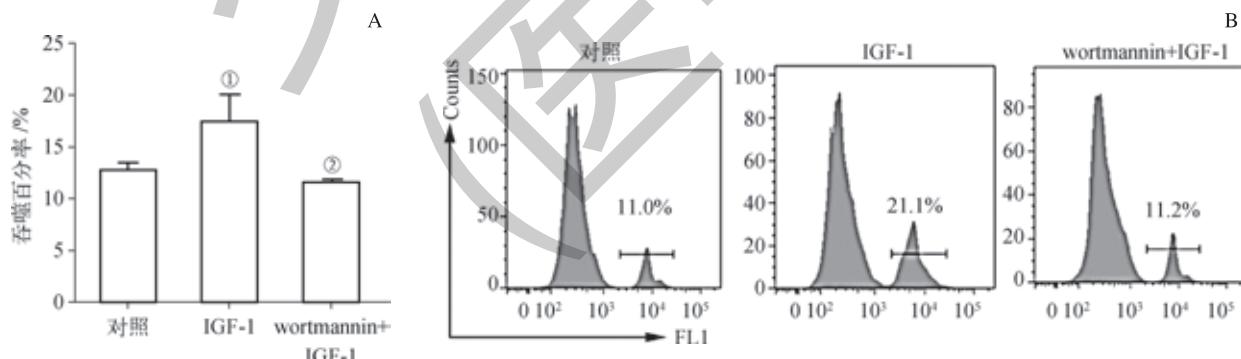
图 1 IGF-1 对 MLE-12 细胞吞噬的促进作用

Fig 1 Promoting effect of IGF-1 on phagocytosis in MLE-12 cells

2.2 IGF-1 通过 PI3K/Akt 途径促进 MLE-12 细胞的吞噬作用

PI3K/Akt 途径是 IGF-1 信号启动的重要胞内信号转导途径^[11], 因此继续观察 PI3K/Akt 途径在 IGF-1 促进 MLE-12 细胞吞噬能力的过程中是否有作用。结果如图 2 所示,

使用 wortmannin (1 $\mu\text{mol/L}$) 阻断 PI3K/Akt 途径后, IGF-1 (50 ng/mL) 促进 MLE-12 细胞吞噬功能的效应完全消失。另外, 在 Western blotting 分析中, IGF-1 刺激的 MLE-12 细胞中出现了明显的 p-Akt 条带 (图 3)。这些结果表明, IGF-1 通过 PI3K/Akt 途径促进 MLE-12 细胞的吞噬作用。



注: A. 荧光微球吞噬率的统计图; B. 代表性的流式细胞术直方图。^① $P=0.011$, ^② $P=0.006$, 与对照组比较。

图 2 PI3K 抑制剂 wortmannin 对 IGF-1 引起的细胞吞噬的影响

Fig 2 Effect of PI3K inhibitor wortmannin on cell phagocytosis induced by IGF-1



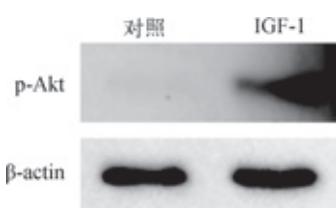
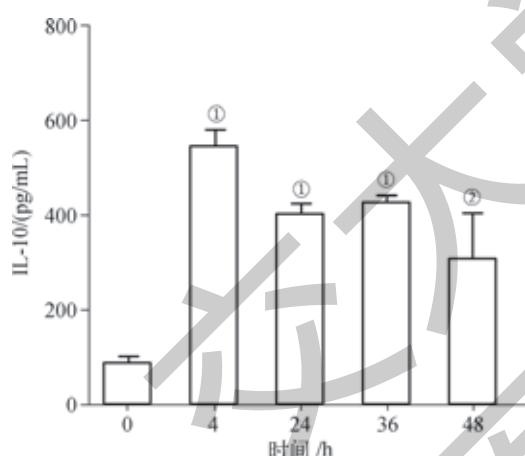


图3 Western blotting 分析 IGF-1 对 MLE-12 细胞 p-Akt 表达的影响
Fig 3 Effect of IGF-1 on p-Akt expression in MLE-12 cells by Western blotting

2.3 IGF-1 促进 MLE-12 细胞分泌 IL-10

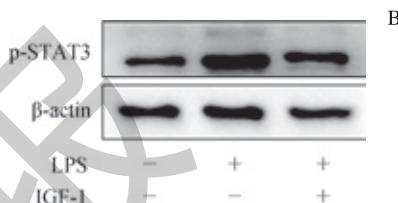
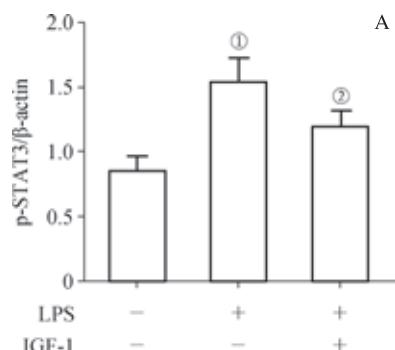
吞噬作用在消除炎症反应中有重要作用。既然 IGF-1 促进 MLE-12 细胞的吞噬作用，则提示 IGF-1 与炎症信号有关联；因此，本研究观察 IGF-1 对 MLE-12 细胞抗炎因子 IL-10 的分泌有何影响。如图 4 所示，IGF-1 (50 ng/mL) 刺激 MLE-12 细胞 4、24、36、48 h 均可以明显促进 MLE-12 细胞分泌 IL-10。这个结果提示 IGF-1 信号有利于炎症反应的消退。



注：^① $P=0.000$ ，^② $P=0.003$ ，与 0 h 组比较。
图4 IGF-1 对 MLE-12 细胞分泌 IL-10 的促进作用
Fig 4 Promoting effect of IGF-1 on IL-10 secretion in MLE-12 cells

2.4 IGF-1 抑制 LPS 诱导的 MLE-12 细胞中 STAT3 激活

STAT3 信号是炎症过程中不可或缺的关键分子^[12]。为进一步明确 IGF-1 信号与炎症的关系，先使用 IGF-1 (50 ng/mL) 处理 MLE-12 细胞 2 h，再加入 LPS (100 ng/mL) 刺激 2 h，然后收集细胞蛋白检测 IGF-1 对 MLE-12 细胞 STAT3 激活的影响。结果如图 5 所示，在 MLE-12 细胞中，IGF-1 抑制了 LPS 诱导的 STAT3 激活。这个结果表明，IGF-1 可以抑制感染过程中的炎症反应。



注：A. Western blotting 积分光密度分析的统计图；B. 代表性的 Western blotting 图。^① $P=0.003$ ，与对照组比较；^② $P=0.036$ ，与 LPS 组比较。

图5 IGF-1 对 LPS 诱导的 STAT3 激活的影响
Fig 5 Effect of IGF-1 on LPS-induced STAT3 activation

3 讨论

吞噬作用是吞噬细胞内化直径大于 0.5 μm 颗粒的过程，是固有免疫的关键机制。吞噬活动除了作为微生物固有免疫的关键执行者外，还是适应性免疫的启动者。在正常的组织平衡和重塑中，吞噬活动在清除死亡细胞中起到关键作用^[6-7]。像上皮细胞这样的非专职吞噬细胞虽然不能内化微生物体，但也能完成吞噬作用。它们能吞噬凋亡体，因此也可在每日大量死亡细胞的更新清除中发挥作用^[8-9]。Juncadella 等^[13]的结果表明，气道上皮细胞能吞噬凋亡的上皮细胞，并建立抗炎的环境从而限制气道的变应性炎症。本研究中，IGF-1 可促进肺泡上皮细胞的吞噬作用，提示 IGF-1 是抑制炎症反应的信号。

IGF-1 信号是高度保守的调控信号，在调控细胞生长、发育和代谢方面有重要作用。IGF-1 主要启动 PI3K/Akt 和 MEK (ERK 激酶)/ERK 2 条主要胞内信号转导途径^[14]。本研究中，我们证明 IGF-1 通过 PI3K/Akt 途径促进 MLE-12 细胞的吞噬作用。Zhou 等^[15]的结果也表明，PI3K/Akt 信号途径在 IGF-1 促进上皮细胞增殖中有重要作用。

IL-10 被认为是炎症反应的主要负性调控者，它在

保护机体免受炎症反应引起的组织损伤中起重要作用。IL-10 可在多种细胞中产生, 如巨噬细胞、树突状细胞、自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞、T 细胞及 B 细胞等^[16-17]。调节性 B 细胞、巨噬细胞、调节性 T 细胞起源的 IL-10 在调控肺部炎症, 维持肺泡内环境平衡中起到重要作用^[18-19]。有研究^[20] 显示在 IL-10 缺陷小鼠中, 肺损伤后的修复减慢。本研究结果表明肺泡上皮细胞可以产生 IL-10, 并且 IGF-1 信号促进 IL-10 这一抗炎因子的分泌, 说明 IGF-1 是抗炎信号。STAT3 分子参与多种疾病的炎症启动过程, 是炎症反应不可或缺的关键分子^[21]。已有研

究^[22] 证明, STAT3 信号介导了香烟烟雾引起的肺部炎症。STAT3 分子还被发现与化脓性链球菌 M1 蛋白诱发的肺部炎症相关, 抑制 STAT3 活性显著减轻肺部炎症^[23]。本研究发现在肺泡上皮细胞中, IGF-1 的刺激抑制了 LPS 诱导的 STAT3 激活, 这进一步说明 IGF-1 对肺泡上皮细胞来说是抗炎信号。

综上所述, IGF-1 通过 PI3K/Akt 途径促进 MLE-12 细胞的吞噬作用; IGF-1 促进 MLE-12 细胞 IL-10 分泌, 并抑制 LPS 诱导的 STAT3 激活。这些结果表明, 在气道炎症的调控中 IGF-1 是一种潜在的抗炎因子。

参·考·文·献

- [1] Nurwidya F, Andarini S, Takahashi F, et al. Implications of insulin-like growth factor 1 receptor activation in lung cancer[J]. Malays J Med Sci, 2016, 23(3): 9-21.
- [2] Yakar S, Adamo ML. Insulin-like growth factor 1 physiology: lessons from mouse models[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2012, 41(2): 231-247.
- [3] Troncoso R, Ibarra C, Vicencio JM, et al. New insights into IGF-1 signaling in the heart[J]. Trends Endocrinol Metab, 2014, 25(3): 128-137.
- [4] Sádaba MC, Martín-Estal I, Puche JE, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) therapy: mitochondrial dysfunction and diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(7): 1267-1278.
- [5] Maggio M, de Vita F, Lauretani F, et al. IGF-1, the cross road of the nutritional, inflammatory and hormonal pathways to frailty[J]. Nutrients, 2013, 5(10): 4184-4205.
- [6] Rosales C, Uribe-Querol E. Phagocytosis: a fundamental process in immunity[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 9042851.
- [7] Gordon S. Phagocytosis: an immunobiologic process[J]. Immunity, 2016, 44(3): 463-475.
- [8] Flanagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis[J]. Annu Rev Pathol, 2012, 7: 61-98.
- [9] Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis[J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(7): 492-502.
- [10] Dos Santos Reis MD, Dos Santos YMO, de Menezes CA, et al. Resident murine macrophage migration and phagocytosis are modulated by growth hormone[J]. Cell Biol Int, 2018, 42(5): 615-623.
- [11] Lin S, Zhang Q, Shao X, et al. IGF-1 promotes angiogenesis in endothelial cells/adipose-derived stem cells co-culture system with activation of PI3K/Akt signal pathway[J]. Cell Prolif, 2017, 50(6): 12390.
- [12] Kasembeli MM, Bharadwaj U, Robinson P, et al. Contribution of STAT3 to inflammatory and fibrotic diseases and prospects for its targeting for treatment[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(8): 2299.
- [13] Juncadella JJ, Kadl A, Sharma AK, et al. Apoptotic cell clearance by bronchial epithelial cells critically influences airway inflammation[J]. Nature, 2013, 493(7433): 547-551.
- [14] Jung HJ, Suh Y. Regulation of IGF-1 signaling by microRNAs[J]. Front Genet, 2015, 5: 472.
- [15] Zhou W, Rowitz BM, Dailey MJ. Insulin/IGF-1 enhances intestinal epithelial crypt proliferation through PI3K/Akt, and not ERK signaling in obese humans[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2018, 243(11): 911-916.
- [16] Hedrich CM, Bream JH. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease[J]. Immunol Res, 2010, 47(1/2/3): 185-206.
- [17] Ogawa Y, Duru EA, Ameredes BT. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation[J]. Curr Mol Med, 2008, 8(5): 437-445.
- [18] Xu S, Xu M, Li GG, et al. Early recruitment of IL-10-producing B cells into alveoli improved the resolution of acute lung injury[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(5): 1752-1760.
- [19] Nie L, Wu W, Lu Z, et al. CXCR3 may help regulate the inflammatory response in acute lung injury via a pathway modulated by IL-10 secreted by CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells[J]. Inflammation, 2016, 39(2): 526-533.
- [20] Aggarwal NR, Tushima K, Eto Y, et al. Immunological priming requires regulatory T cells and IL-10-producing macrophages to accelerate resolution from severe lung inflammation[J]. J Immunol, 2014, 192(9): 4453-4464.
- [21] He G, Karin M. NF-κB and STAT3: key players in liver inflammation and cancer[J]. Cell Res, 2011, 21(1): 159-168.
- [22] Jiang JX, Zhang SJ, Shen HJ, et al. Rac1 signaling regulates cigarette smoke-induced inflammation in the lung via the Erk1/2 MAPK and STAT3 pathways[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(7): 1778-1788.
- [23] Zhang S, Hwaiz R, Luo L, et al. STAT3-dependent CXC chemokine formation and neutrophil migration in streptococcal M1 protein-induced acute lung inflammation[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 308(11): L1159-L1167.

[收稿日期] 2018-10-07

[本文编辑] 崔黎明

