

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.10.002

❖ 基础研究 ❖

# S100A8 对大鼠肺泡巨噬细胞炎症因子释放水平的影响

刘琴<sup>1</sup>, 杨陈武<sup>3</sup>, 刘小燕<sup>1</sup>, 欧国春<sup>4</sup>, 陈小菊<sup>2</sup>

(1. 川北医学院附属医院呼吸与危重症医学科, 四川南充 637000; 2. 成都大学附属医院呼吸与危重症医学科, 四川成都 610081; 3. 川北医学院附属医院医学影像研究所, 四川南充 637000; 4. 遂宁市中心医院呼吸与危重症医学科, 四川遂宁 629000)

**【摘要】目的:** 探讨 S100A8 siRNA 对脂多糖诱导的大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 炎症介质释放水平的影响。**方法:** 构建 S100A8 siRNA 载体, 利用脂质体 Lipofectamine™ 2000 转染 NR8383 细胞, 荧光定量 PCR 检测 S100A8 基因的沉默效率。不同浓度 (0.1 ~ 10 μg/mL) 的脂多糖刺激 S100A8 沉默组和阴性对照组细胞 2 h, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测上清液中白细胞介素-6 (IL-6)、IL-8 和肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 的浓度。**结果:** S100A8 siRNA 转染至 NR8383 细胞后, S100A8 mRNA 的表达降低 ( $P < 0.05$ )。随着脂多糖刺激浓度增加, S100A8 沉默组和阴性对照组细胞上清液中 IL-6、IL-8 和 TNF-α 浓度均逐渐增加, 各浓度组与 0 μg/mL 组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 各浓度组之间两两比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。以相同浓度脂多糖刺激 S100A8 沉默组和阴性对照组细胞, 阴性对照组细胞上清液中 IL-6、IL-8 和 TNF-α 浓度均高于 S100A8 沉默组 ( $P < 0.05$ )。**结论:** S100A8 siRNA 通过下调 NR8383 细胞中 S100A8 基因的表达, 减轻了脂多糖诱导的炎症介质的释放, 有望作为炎症疾病治疗的潜在靶点。

**【关键词】** 大鼠肺泡巨噬细胞; S100A8; 脂多糖; siRNA; 炎症介质

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标志码】** A

## Effect of S100A8 on the release of inflammatory factors from rat alveolar macrophages

LIU Qin<sup>1</sup>, YANG Chen-wu<sup>3</sup>, LIU Xiao-yan<sup>1</sup>, OU Guo-chun<sup>4</sup>, CHEN Xiao-ju<sup>2</sup>

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Chengdu University, Chengdu 610081; 3. Institute of medical imaging, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000; 4. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Suining Central Hospital, Suining 629000, Sichuan, China)

**【Abstract】Objective:** To explore the effect of S100A8 siRNA on the release of inflammatory mediators from lipopolysaccharide (LPS) induced rat alveolar macrophages NR8383. **Methods:** S100A8 siRNA was constructed and transfected into NR8383 cells with Lipofectamine™ 2000. The silencing efficiency of S100A8 gene was detected by RT-qPCR. The cells of S100A8 silence group and negative control group were stimulated with different concentrations of LPS (0.1 μg/ml - 10 μg/ml) for 2 hours, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the concentration of IL-6, IL-8 and TNF-α in the supernatant. **Results:** After S100A8 siRNA was transfected into NR8383 cell, the expression of S100A8 mRNA was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). As the increase of LPS stimulation concentration, the concentrations of IL-6, IL-8 and TNF-α in the supernatant of S100A8 silencing group and negative control group gradually increased, there was significant difference between concentration groups and 0 μg/mL group ( $P < 0.05$ ). There was significant difference between each concentration groups ( $P < 0.05$ ). Used the same concentration of LPS to stimulate the S100A8 silenced-cells and the negative control-cells, the concentrations of IL-6, IL-8 and TNF-α in the supernatant of the negative control group were higher than those of the S100A8 silenced group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** S100A8 siRNA reduces the release of inflammatory mediators induced by lipopolysaccharide by down-regulating the expression of S100A8 gene in NR8383 cells, and is expected to be a potential target for the treatment of inflammatory diseases.

**【Key words】** Rat alveolar macrophage cell; S100A8; LPS; Small Interfering RNA; Inflammatory mediators

S100A8 是 S100 钙结合蛋白家族主要成员之一, 在中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞等髓系细胞

基金项目: 四川省南充市校合作科研专项 (18SXHZ0253); 川北医学院科研发展项目 (CBY13-A-QN21)

作者简介: 刘琴 (1990 -), 女, 硕士, 住院医师。E-mail: 570334832@qq.com

通讯作者: 陈小菊, 博士。E-mail: cxj9592@163.com

中高表达<sup>[1]</sup>。在炎症反应中, S100A8 由活化的巨噬细胞分泌, 再与巨噬细胞、内皮细胞或淋巴细胞结合后发挥抗炎作用<sup>[2]</sup>。S100A8 能够与脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 产生协同作用, 放大 LPS 的促炎效应<sup>[3]</sup>。肺泡巨噬细胞是参与肺部炎症的重要细胞, S100A8 呈剂量、时间依赖性刺激大鼠肺泡巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8) 等炎症介质<sup>[4]</sup>。本研究拟探讨 S100A8 siRNA 对脂多糖诱导肺泡巨噬细胞释放各炎症介质的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大鼠肺泡巨噬细胞株 NR8383 购自中国科学院细胞库, S100A8 siRNA 的构建及引物合成由上海生物工程有限公司完成。Ham's F-12K 基础培养基 (Procell, 中国), 胎牛血清 (HyClone, 美国), 青霉素-链霉素双抗 (HyClone, 美国), Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen, 美国), 脂多糖 (Sigma, 美国), 总 RNA 提取试剂 Trizol (Invitrogen, 美国), RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, 美国), All-in-one qPCR Mix (GeneCopoeia, 美国), 大鼠 IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒 (NeoBioscience, 中国)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 NR8383 细胞用含 15% 胎牛血清的 Ham's F-12K 培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。

1.2.2 细胞转染 转染当天取对数生长期的细胞, 用 6 cm 皿进行细胞铺板, 铺板细胞数为  $1.2 \times 10^6$  个/6 cm 皿, siRNA: Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 = 20 pmol; 1.5  $\mu$ L, 转染步骤参照 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 产品说明书进行。细胞转染分 S100A8 沉默组和阴性对照组: S100A8 沉默组为 S100A8-Rat-52 siRNA 组, 阴性对照组为转染无关序列 siRNA 组。转染后 24 h 收集细胞, 平行试验进行 3 次。(1) S100A8-Rat-52 siRNA 序列: 正链: 5'-GCAACGUCUAUGAAGUC-UATT-3'; 反链: 5'-UAGACUCAAUGACGUUGCTT-3'。(2) 阴性对照 siRNA 序列: 正链: 5'-UUCUC-CGAACGUGUCACGUTT-3'; 反链: 5'-ACGUGA-CACGUUCGGAGAATT-3'。

1.2.3 荧光定量 PCR 法检测目的基因表达水平 用 Trizol 法在超净环境中提取总 RNA, 均使用无菌无 RNA 酶器材。将总 RNA 逆转录为 cDNA, PCR 法对 S100A8 基因进行扩增, 选择 GAPDH 为内参基

因。大鼠 S100A8 基因引物序列: 上游引物: 5'-ACAGGGATGACTTCAGGAAAAT G-3', 下游引物: 5'-CCACCCTTATCACCAAGACAAG-3', 扩增片段长度: 147 bp。大鼠 GAPDH 基因引物序列: 上游引物: 5'-AAGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3', 下游引物: 5'-TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG GTC-3', 扩增片段长度: 115 bp。

逆转录及 PCR 均严格按照说明书进行, 每个基因均为 3 个复孔。逆转录及 PCR 反应体系均为 20  $\mu$ L, 逆转录条件为 42 °C、60 min, 70 °C、5 min。优化 PCR 反应程序: 预变性 95 °C 10 min; 变性 95 °C 10 s, 退火 62 °C 20 s, 延伸 72 °C 15 s; 扩增 50 个循环。用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算基因相对表达水平。

1.2.4 LPS 刺激转染后细胞 分为 S100A8 沉默组和阴性对照 (无关序列 siRNA) 组, siRNA 片段成功转染细胞 24 h 后, 细胞生长状态良好, 收集细胞并以  $1 \times 10^5$  的密度接种 24 孔板, 每孔 500  $\mu$ L。用 LPS 刺激细胞, 按照 LPS 刺激浓度, 分为 4 组, 分别加入稀释后的 LPS 至终浓度为 10  $\mu$ g/mL、1  $\mu$ g/mL、0.1  $\mu$ g/mL、0  $\mu$ g/mL, 完成干预后细胞继续放回细胞培养箱中培养。每个浓度均设置 3 个复孔。再继续培养 2 h 后, 取出 24 孔板, 分别收集以上各组细胞的上清液 (4 °C, 1 500 rpm, 离心 5 min), 保存于 -20 °C 冰箱中。

1.2.5 细胞上清液中各细胞因子浓度的检测 ELISA 法检测细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-8 和 IL-6 的浓度, 实验按照 ELISA 试剂盒说明书进行。绘制 ELISA 标准曲线, 通过曲线求得各样本的浓度。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS23.0 软件进行统计分析。计量资料用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组独立样本之间比较采用 *t* 检验, 多组样本比较组间差异采用单因素方差分析; 基因沉默率为干扰后目的基因表达量与阴性对照组表达量的相对差异百分比。计数资料以 [*n*(%)] 表示, 组间比较使用  $\chi^2$  检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞转染效率观察

在倒置荧光显微镜下观察, 带绿色荧光的细胞即为转染成功的细胞, 转染率 = 同一视野绿色荧光细胞数/白光下细胞总数。本实验用 siRNA: Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 = 20 pmol; 1.5  $\mu$ L 转染 NR8383 细胞, 转染效率 > 80%。见图 1。

2.2 转染后 NR8383 细胞 S100A8 基因的沉默效率 转染 24 h 后检测 S100A8 基因的相对表达,

S100A8-Rat-52 siRNA 沉默组 S100A8 基因相对表达量为 0.136(沉默率 86.4%)。见图 2。

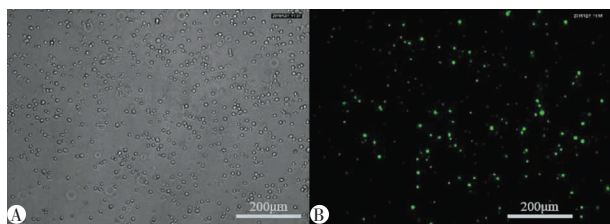


图 1 脂质体转染 NR8383 细胞株的转染效果

A.白色背景(未激发荧光)细胞数;B.激发绿色荧光细胞数(10 $\times$ )。

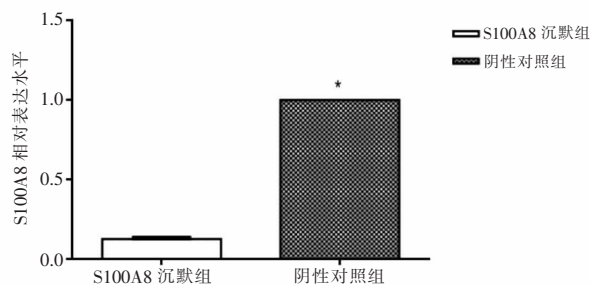


图 2 S100A8 沉默组与阴性对照组的基因相对表达水平

S100A8 沉默组与阴性对照组中 S100A8 基因的相对表达水平。 $*P < 0.05$ ,与阴性对照组相比。

### 2.3 不同浓度 LPS 刺激 S100A8 沉默组和阴性对照组细胞,上清液中炎症介质浓度的变化

增加 LPS 的刺激浓度,S100A8 沉默组和阴性对照组细胞上清液中 IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  浓度均逐渐增加,各浓度组与 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的阴性对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),各浓度组两两比较,差异也均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1、表 2、表 3 和图 3。

以相同浓度 LPS 刺激 S100A8 沉默组和阴性对照组 2 h,阴性对照组细胞上清液中 IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  的浓度均高于 S100A8 沉默组细胞的,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 4。

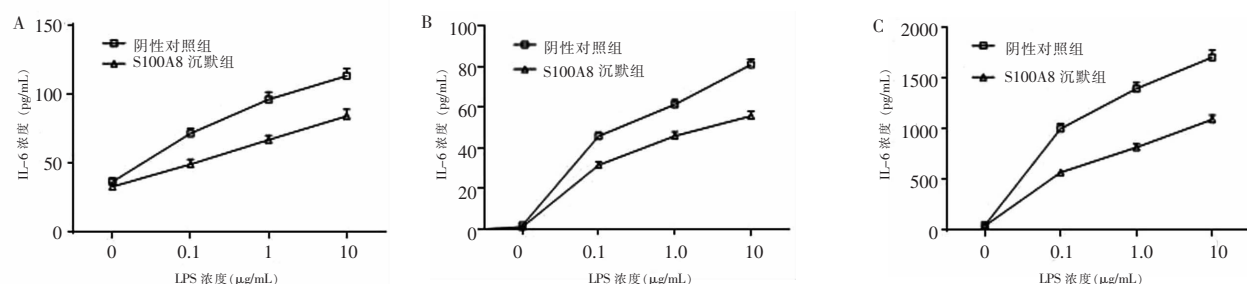


图 3 不同浓度 LPS 对 S100A8 沉默组细胞和阴性对照组细胞分泌炎症介质的影响

A.IL-6;B.IL-8;C.TNF- $\alpha$ 。

表 1 不同浓度 LPS 对 S100A8 沉默组和阴性对照组细胞分泌 IL-6 的影响 ( $\bar{x} \pm s, \text{pg}/\text{mL}$ )

LPS( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	孔数( $n$ )	S100A8 沉默组	阴性对照组
0	3	33.242 $\pm$ 3.677	36.727 $\pm$ 3.526
0.1	3	49.303 $\pm$ 4.727 *	71.606 $\pm$ 5.086 *
1	3	66.879 $\pm$ 4.581 *#	96.061 $\pm$ 7.278 *#
10	3	84.091 $\pm$ 6.938 *# $\Delta$	113.061 $\pm$ 7.689 *# $\Delta$
F 值		36.768	57.828
P 值		<0.001	<0.001

\* $P < 0.05$ ,与阴性对照组比较;# $P < 0.05$ ,与 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组比较; $\Delta P < 0.05$ ,与 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组比较。

表 2 不同浓度 LPS 对 S100A8 沉默组和阴性对照组细胞分泌 IL-8 的影响 ( $\bar{x} \pm s, \text{pg}/\text{mL}$ )

LPS( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	孔数( $n$ )	S100A8 沉默组	阴性对照组
0	3	1.094 $\pm$ 0.274	1.877 $\pm$ 0.298
0.1	3	31.646 $\pm$ 2.185 *	45.886 $\pm$ 2.562 *
1	3	45.950 $\pm$ 2.684 *#	61.490 $\pm$ 3.417 *#
10	3	55.799 $\pm$ 3.407 *# $\Delta$	81.122 $\pm$ 3.614 *# $\Delta$
F 值		192.237	289.718
P 值		<0.001	<0.001

\* $P < 0.05$ ,与阴性对照组比较;# $P < 0.05$ ,与 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组比较; $\Delta P < 0.05$ ,与 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组比较。

表 3 不同浓度 LPS 对 S100A8 沉默组和阴性对照组细胞分泌 TNF- $\alpha$  的影响 ( $\bar{x} \pm s, \text{pg}/\text{mL}$ )

LPS( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	孔数( $n$ )	S100A8 沉默组	阴性对照组
0	3	43.143 $\pm$ 3.559	47.690 $\pm$ 4.377
0.1	3	571.595 $\pm$ 32.661 *	1004.952 $\pm$ 65.451 *
1	3	817.881 $\pm$ 47.521 *#	1398.619 $\pm$ 85.026 *#
10	3	1094.714 $\pm$ 60.248 *# $\Delta$	1709.524 $\pm$ 101.774 *# $\Delta$
F 值		229.28	190.375
P 值		<0.001	<0.001

\* $P < 0.05$ ,与阴性对照组比较;# $P < 0.05$ ,与 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组比较; $\Delta P < 0.05$ ,与 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组比较。

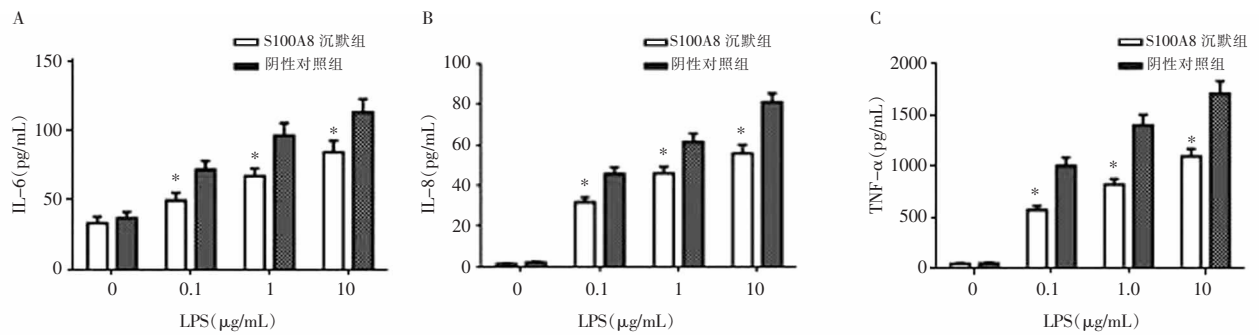


图 4 不同浓度 LPS 刺激 NR8383 细胞 2h 后细胞上清液中炎症介质释放量的比较

A.IL-6;B.IL-8;C.TNF-α。\*P<0.05,与阴性对照组相比。

### 3 讨论

在急性或慢性炎症反应中,活化的巨噬细胞可主动分泌 S100A8<sup>[5]</sup>,而细胞外的 S100A8 可以与单核细胞、内皮细胞以及巨噬细胞等细胞表面的葡聚糖结合,激活 Toll 样受体 4 (toll-like receptors, TLR4) 和晚期糖基化受体 (receptors of advanced glycation endproducts, RAGE) 等模式识别受体,继而发挥促炎作用<sup>[6-7]</sup>。S100A8 可以激活单核细胞和巨噬细胞中的依赖核因子 κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 信号通路,使得 TNF-α 的产生和分泌增多,进一步放大炎症反应<sup>[8]</sup>。

LPS 是 G-细菌细胞壁的主要组成部分,可作用于肺泡巨噬细胞、中性粒细胞和内皮细胞等,刺激细胞产生 IL-1、IL-6、IL-8 和 TNF-α 等炎症介质,是临床上炎症感染的主要因素<sup>[9]</sup>。本研究发现,予以不同浓度 LPS 刺激大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383,随着 LPS 浓度的增加,细胞上清液中 IL-6、IL-8 和 TNF-α 浓度均逐渐增加,提示 LPS 对肺泡巨噬细胞 NR8383 的刺激呈浓度依赖性,这与既往的研究<sup>[10]</sup>类似。

另外,本研究进一步成功沉默了 NR8383 细胞中的 S100A8 基因,再予以 LPS 刺激 S100A8 沉默组和阴性对照组细胞,阴性对照组细胞上清液中 IL-6、IL-8 和 TNF-α 浓度均高于 S100A8 沉默组,提示 NR8383 细胞中 S100A8 基因被沉默后,肺泡巨噬细胞受 LPS 刺激后释放的炎症介质 IL-6、IL-8 和 TNF-α 水平降低,这证实了脂多糖诱导的炎症反应与 S100A8 有着密切关系。LPS 可能先诱导肺泡巨噬细胞产生 S100A8,S100A8 再刺激其产生炎症介质。既往研究<sup>[11-12]</sup>已证实脂多糖可诱导巨噬细胞产生 S100A8,而 S100A8 可直接刺激离体培养的肺泡巨噬细胞分泌 IL-6、IL-8 和 TNF-α 增多<sup>[4]</sup>。

综上,脂多糖呈浓度依赖性地刺激 NR8383 细胞分泌炎症介质 IL-6、IL-8 和 TNF-α。LPS 诱导的 NR8383 细胞内 S100A8 基因的表达降低后,IL-6、IL-8 和 TNF-α 等炎症因子的水平也明显降低,即脂多糖诱导的炎症反应与 S100A8 密切相关。

### 参考文献

- [1] Abtin A, Eckhart L, Glaser R, et al. The antimicrobial heterodimer S100A8/S100A9 (calprotectin) is upregulated by bacterial flagellin in human epidermal keratinocytes [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2010, 130 (10): 2423 - 2430.
- [2] Petersen B, Wolf M, Austermann J, et al. The alarmin Mrp8/14 as regulator of the adaptive immune response during allergic contact dermatitis [J]. EMBO Journal, 2013, 32 (1): 100 - 111.
- [3] Chakraborty D, Zenker S, Rossaint J, et al. Alarmin S100A8 Activates Alveolar Epithelial Cells in the Context of Acute Lung Injury in a TLR4-Dependent Manner [J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8 (1493): 1 - 16.
- [4] 陈小菊,周智,冷长燕,等. 钙结合蛋白 S100A8、S100A9 在大鼠肺泡巨噬细胞中的表达及作用 [J]. 国际呼吸杂志, 2019, 39 (8): 561 - 566.
- [5] Pruenster M, Kurz AR, Chung KJ, et al. Extracellular MRP8/14 is a regulator of beta2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion [J]. Nature Communications, 2015, 6: 6915.
- [6] Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock [J]. Nature Medicine, 2007, 13 (9): 1042 - 1049.
- [7] Ehlermann P, Eggers K, Bierhaus A, et al. Increased proinflammatory endothelial response to S100A8/A9 after preactivation through advanced glycation end products [J]. Cardiovascular Diabetology, 2006, 5 (6): 1 - 9.
- [8] Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, et al. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Research & Therapy, 2006, 8 (R69): 1 - 12.
- [9] Standiford TJ, Ward PA. Therapeutic targeting of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome [J]. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 2016, 167 (1): 183 - 191.
- [10] Chen H, Bai C, Wang X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine [J]. Expert Review of Respiratory Medicine, 2010, 4 (6): 773 - 783.
- [11] 饶亚岚,丛悦,陈肖华,等. γ 射线与 LPS 作用于小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的生物学效应 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 9: 850 - 852.
- [12] Yen T, Harrison CA, Devery JM, et al. Induction of the S100 chemotactic protein, CP-10, in murine microvascular endothelial cells by proinflammatory stimuli [J]. Blood, 1997, 90 (12): 4812 - 4821.

(收稿日期:2021-03-15)

修回日期:2021-05-27)