

绿脓菌素激活 MAPKs、NF- κ B 信号通路 诱导呼吸道上皮细胞 IL-8 表达

冯 艳¹ 王 芳¹ 李 响² 王伯瑶¹ 吴 琦^{1*}

(四川大学¹ 华西基础医学与法医学院感染免疫教研室 ² 华西医院泌尿外科 成都 610041)

摘 要 采用绿脓杆菌培养上清及绿脓菌素刺激人呼吸道上皮细胞株 A549 和 SPC-A-1 用 ELISA 方法检测细胞 IL-8 分泌水平,并使用免疫印迹(Western blot)方法观察绿脓菌素对细胞内重要的炎症信号传导途径 NF- κ B 及丝裂原激活蛋白激酶(MAPKs)的激活作用。实验发现,绿脓杆菌培养上清及绿脓菌素可诱导呼吸道上皮细胞株 IL-8 分泌增加,且具有剂量依赖效应。绿脓菌素刺激细胞可使细胞内 I κ B- α 发生降解,同时使 MAPK 家族蛋白分子(ERK1/2、p38、JNK)发生磷酸化。MEK1/2(ERK1/2 激酶)抑制剂 U0126(10 μ mol/L)和 p38 MAPK 抑制剂 SB203580(10 μ mol/L)可降低绿脓菌素诱导 A549 细胞 IL-8 的合成。以上结果显示绿脓菌素通过 MAPK 信号传导通路增强呼吸道上皮细胞 IL-8 的表达,NF- κ B 通路也参与了绿脓菌素调控细胞 IL-8 表达的过程。

关键词 呼吸道上皮细胞 绿脓菌素 丝裂原激活蛋白激酶 核转录因子 NF- κ B

中图分类号 Q935 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2005)01-0086-05

绿脓杆菌是极为重要的条件致病菌,广泛存在于土壤、水及各种动物体内,它具有先天的和后天获得的耐药性,并具有多重耐药的特点,一旦感染,临床治疗十分困难。在烧伤后化脓性感染中,绿脓杆菌是主要的致病菌。近年来医院内感染成为日益严重的临床问题,对医院内呼吸道感染病原学调查显示,绿脓杆菌排在首位。呼吸道慢性绿脓杆菌感染往往引起严重的肺组织炎症病变和肺功能损害,最后导致病人死亡。肺囊性纤维化病(Cystic fibrosis, CF)就是一种典型病例,由于患者呼吸道反复绿脓杆菌感染,最终导致严重的肺功能受损,这类病人的平均寿命只有 30 岁^[1]。

绿脓杆菌感染的肺部往往有显著的炎症反应,尤其是大量的中性粒细胞(PMNs)在发病部位聚集。比如在 CF 病人,肺组织慢性反复绿脓杆菌感染,却呈现出急性炎症反应的病理改变特征(大量的 PMNs 在肺部聚集)。探讨绿脓杆菌感染后机体炎症反应的分子机制,包括炎症细胞聚集机制,炎症组织损伤机制等,成为研究绿脓杆菌感染发病机理的重要内容。IL-8 是最为重要的 PMNs 趋化因子,IL-8 释放的增加是导致感染肺部 PMNs 增多最主要的原因^[2]。体外实验观察到绿脓杆菌可分泌多种因子诱导呼吸

道上皮细胞 IL-8 的表达,如粘附素、菌毛蛋白、鞭毛蛋白、绿脓菌素等,但是这些因子诱导呼吸道上皮细胞炎症反应的机理,特别是炎症信号涉及的受体分子以及信号转导途径^[3,4],至今没有阐明。本实验首次显示绿脓杆菌分泌的重要致病分子绿脓菌素,通过 MAPK 和 NF- κ B 信号传导通路,刺激呼吸道上皮细胞 IL-8 的表达。

1 材料和方法

1.1 材料

人肺腺癌上皮细胞株 SPC-A-1 及人肺癌细胞株 A549 均为我室保存。PMS(phenazine methosulfate), NP-40, Na₃VO₄, TPCK, quercetin, PMSF, leupeptin, pepstatin 为 Sigma 产品。DMEM、小牛血清购自 GIBCO 公司。DuoSet ELISA Develop System human IL-8 为 R&D Systems 公司产品。I κ B- α 抗体,磷酸化 MAPK 抗体(包括 phospho-ERK1/2, phospho-JNK, phospho-p38)及 MEK1/2(为 ERK1/2 激酶)抑制剂 U0126 购自 Cell Signaling Technology。p38 MAPK 抑制剂 SB203580 为 Sigma 公司产品。 β -actin 抗体购自 Santa Cruz,化学发光检测试剂盒 ECL + plus 购自 Amersham Biosciences。

基金项目 国家自然科学基金(30270688);GMB 科研基金(98-681)

* 通讯作者。Tel 86-28-85503159 E-mail liaohw66@sina.com

作者简介 冯 艳(1972-)女,广西梧州人,博士研究生,主要从事感染免疫方面的研究。E-mail fy575@163.com

收稿日期 2004-07-05,修回日期 2004-11-10

1.2 绿脓菌素的提取和纯化

1.2.1 绿脓菌素的提取 参考文献采用光分解法从 PMS(phenazine methosulfate) 获取绿脓菌素^[5]。50mg PMS 溶于 100mL Tris-HCl(pH 7.0, 0.1mol/L), 置于荧光灯下大约 10cm 处, 室温光照 3d 直至溶液变为深蓝色。用 30mL 氯仿抽提 6 次, 收取氯仿相, 与 0.2mol/L 盐酸 3:1 混匀, 1500r/min 离心 5min, 吸取呈红色的水相, 用碳酸氢钠中和至溶液呈蓝色, 再用 1/3 体积的氯仿抽提, 如此反复抽提 3 次, 最后氯仿相在室温下挥发干燥, 所得绿脓菌素用灭菌蒸馏水溶解 4℃避光保存。

1.2.2 绿脓菌素的纯化 反相高效液相色谱(HPLC)进一步纯化绿脓菌素。采用 C18 反相柱, 分离条件: A 液为 0.1% 三氟乙酸(TFA), B 液为 0.1% TFA/100% 乙腈, 作 0~30min 线性梯度洗脱(从 A 液到 B 液) 检测波长 280nm, 流速 1mL/min, 收集洗脱液 1mL/管, 在第 8min 左右出现吸收峰, 将该吸收峰洗脱液收集并冷冻干燥, 溶于灭菌蒸馏水。采用紫外分光光度计于 200~400nm 扫描所得绿脓菌素的吸收光谱, $\lambda_{\max} = 278\text{nm}$, 与文献描述的绿脓菌素吸收光谱特性相符^[6]。

1.3 绿脓杆菌培养上清(TSB-Conditioned medium, 简称 TSCM)的制备

绿脓杆菌标准株 PAO1, 于 3% TSB 培养基中 37℃ 孵箱振荡培养 72h, 4℃、25000r/min 离心 30min, 收集上清用 0.22 μm 膜过滤, -70℃ 保存备用。为了灭活 TSCM 中能够引起细胞漂浮的蛋白酶, 刺激细胞前 TSCM 在沸水中隔水煮 20min。

1.4 细胞培养及刺激实验

SPC-A-1 及 A549 细胞在 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养, 采用 DMEM 培养基, 其中含 10% 小牛血清、100U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素。刺激实验在 48 孔细胞培养板中进行, 每孔接种 6 万个细胞, 细胞生长 3d 后, 达到 90% 以上的融合, 分别加入相应浓度的 TSCM(以培养基 TSB 为对照), 刺激 24h 后收集上清待测。

在绿脓菌素刺激实验中, 预实验显示在无血清或者有血清的条件下绿脓菌素都可以增强上皮细胞 IL-8 的表达, 但是完全撤去血清可能影响细胞的生长及活力, 因此选用含有 5% 人血清 DMEM 培养基, 绿脓菌素的浓度分别是 5、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 细胞刺激 24h 后收集上清待测。

在观察 MAPK 通路抑制剂的实验中, 细胞先用 U0126(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 或 SB203580(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 预处理

60min, 再加入绿脓菌素(终浓度为 0, 10, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激细胞 24h, 收集上清待测。

以上实验中, 不同的实验浓度均采用 3 复孔, 并重复 3 次以上。

1.5 ELISA

使用人 IL-8 ELISA 试剂盒, 按操作说明书检测细胞培养上清 IL-8 浓度。用 Bio-rad 550 型酶标仪 490nm 测定样品 OD 值。绘制标准曲线所用 IL-8 标准品浓度为 32.5~2000pg/mL。实验数据以 Excel 进行统计学分析。

1.6 免疫印迹试验

A549 细胞用 35mm 培养皿培养至 90% 融合, 用 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的绿脓菌素刺激细胞, 分别于刺激后 10、30、60、120min 用 200 μL 预冷的细胞裂解液破裂细胞提取细胞蛋白(0min 即细胞培养液中不含绿脓菌素)。裂解液的组成为: 100mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 100mmol/L NaCl, 50mmol/L NaF, 2mmol/L EDTA, 1% NP-40, 1mmol/L Na₃VO₄, 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ TPCK, 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ quercetin, 1mmol/L PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin 及 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatin。收集细胞到 1.5mL 离心管中, 置冰上 30min 并不时旋涡震荡, 4℃、12000r/min 离心 20min 收集上清。提取的细胞蛋白样品用 BCA 试剂盒(Pierce Biotechnology)测定蛋白浓度。每份样品取 40 μg 进行 12% SDS-PAGE 分析, 湿式转移法转至 PVDF 膜(Millipore)。PVDF 膜用 5% 的脱脂奶粉封闭, 加入一抗, 于 4℃ 振荡过夜, 加入 HRP 耦联二抗, 最后用 ECL+ plus 试剂作化学发光检测, 化学发光成像采用冷 CCD 照相装置(Omega 16ic)。为了确证每份样品上样量一致, 将检测过的 PVDF 膜信号洗去(stripping), 再用抗 β -actin 抗体进行二次杂交作为内对照。实验重复 3 次。

2 结果

2.1 绿脓杆菌培养上清(TSCM)及绿脓菌素可增强肺腺上皮细胞 IL-8 的表达

使用不同浓度的 TSCM 刺激 A549 及 SPC-A-1 细胞, 可使细胞分泌 IL-8 显著增加, 这种效应呈浓度依赖性。如图 1-A 所示, 培养液中含有 2.5%、5%、10%、20% 的 TSCM(V/V) 时分别可使 A549 细胞分泌的 IL-8 浓度较不含 TSCM 的升高 1.6、3.3、7.8 和 13.4 倍, SPC-A-1 细胞则分别升高 1.3、2.5、5.8 和 10.7 倍。

使用 PMS 光分解法提取纯化的绿脓菌素刺激 A549 和 SPC-A-1 细胞, 可使 IL-8 分泌增加, 在刺激

浓度为 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 时细胞反应最强。绿脓菌素刺激浓度为 5、25、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 可使 A549 细胞分泌的 IL-8 浓度分别升高 3.2、8.4、4.8 倍。刺激 SPC-A-1 细胞分别升高 3.0、8.7、7.0 倍(图 1-B)。当绿脓菌素浓度达 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,倒置显微镜下观察可见绿脓菌素对细胞有一定的毒性,这可能是细胞 IL-8 分泌有所降低的原因。

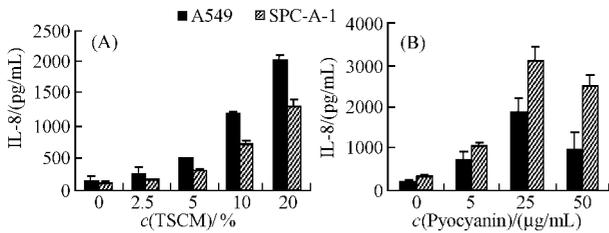


图 1 (A) 绿脓杆菌培养上清对 A549 和 SPC-A-1 细胞 IL-8 分泌的影响;(B) 绿脓菌素对 A549 和 SPC-A-1 细胞 IL-8 分泌的影响

Fig.1 (A) Effect of *P. aeruginosa* conditioned medium (TSCM) on IL-8 release from A549 and SPC-A-1 cells;(B) Effect of pyocyanin on IL-8 release from A549 and SPC-A-1 cells.

2.2 绿脓菌素刺激细胞可使 NF- κ B 信号传导通路激活

绿脓菌素($25\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激 A549 细胞,于 0、10、30、60、120min 时收集细胞蛋白,用 Western blot 方法检测 NF- κ B 信号传导通路重要分子 I κ B- α 的动态变化。结果显示在刺激 30min 后 I κ B- α 开始发生降解,而在第 60、120min 可使 I κ B- α 的降解更加明显(图 2)。

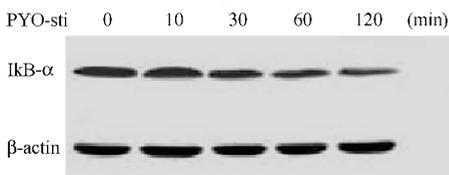


图 2 绿脓菌素刺激 A549 细胞使 I κ B- α 发生降解

Fig.2 Western blot analysis of I κ B- α degradation in A549 cells stimulated with pyocyanin

2.3 绿脓菌素刺激细胞可激活 MAPK 家族

绿脓菌素($25\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激 A549 细胞,于 0、10、30、60、120min 时收集细胞蛋白,用 Western blot 方法检测 MAPK 家族蛋白分子激活磷酸化状态的动态变化。结果显示绿脓菌素刺激细胞 10min 后,ERK1/2、p38、JNK 蛋白的磷酸化显著增加(图 3)。

2.4 MAPKs 抑制剂 U0126 和 SB203580 阻断绿脓菌素诱导细胞 IL-8 的合成

本实验在免疫印迹观察到绿脓菌素可诱导

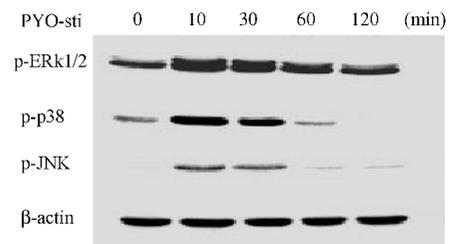


图 3 绿脓菌素刺激 A549 细胞使 MAPKs 发生磷酸化

Fig.3 Western blot analysis of MAPK protein phosphorylation in A549 cells stimulated with pyocyanin

MAPKs 蛋白磷酸化的基础上,使用 MAPK 通路抑制剂预处理细胞,观察阻断 MAPK 通路后对绿脓菌素增强细胞 IL-8 表达是否有影响。结果显示,与未经抑制剂处理的细胞相比较,MAPK 通路抑制剂可部分降低由绿脓菌素诱导的 IL-8 合成。如图 4 所示,未经抑制剂处理的细胞用 10、 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 的绿脓菌素刺激,IL-8 浓度与无绿脓菌素刺激的细胞相比较平均升高 2.2 倍和 3.7 倍。细胞经 U0126 预处理后用相同浓度的绿脓菌素刺激细胞,IL-8 浓度平均升高 1.5 倍和 2.5 倍;经 SB203580 预处理后平均升高 1.2 倍和 2.4 倍,联合使用 U0126 和 SB203580 预处理细胞,则平均升高 1.7 倍和 2.4 倍。各组与未经抑制剂处理的细胞相比较均具有显著性差异($P < 0.05$)。

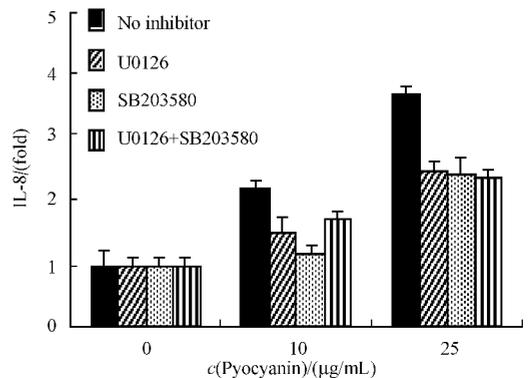


图 4 MAPKs 抑制剂对绿脓菌素诱导 A549 细胞 IL-8 表达的影响

Fig.4 Effects of MAPKs inhibitors on pyocyanin-induced IL-8 release from A549 cells

3 讨论

呼吸道上皮细胞是呼吸道防御微生物感染的第一道屏障,致病菌要在上皮细胞表面粘附、定植并生长,最后突破这个屏障向粘膜下侵袭,因此呼吸道上皮细胞与病原微生物的相互关系是研究微生物致病机理的重要内容。上皮细胞不但扮演阻隔病原体入

侵的机械屏障角色,也是机体炎症和免疫反应的积极参与者,病原微生物感染的炎症信号往往由上皮细胞最先发出,通过感知病原微生物(以及微生物的产物)激活上皮细胞内复杂的炎症信号传递机制,表达和分泌重要的炎症细胞因子,由此将病原体入侵的信号向其他免疫细胞(中性粒细胞、单核/巨噬细胞、淋巴细胞等)传递。

绿脓杆菌呼吸道感染引发强烈的炎症反应,这从临床病理学观察结果,以及利用培养的上皮细胞进行的体外实验都可以得到证实。我们在预实验中曾经比较过多种细菌培养上清对呼吸道上皮细胞的炎症刺激作用,包括金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯杆菌,结果发现这些细菌培养上清只有温和的刺激作用,上皮细胞 IL-8 分泌升高不超过两倍,但是绿脓杆菌培养上清能够使上皮细胞 IL-8 分泌升高超过 10 倍以上。绿脓杆菌(及其分泌产物)诱发炎症反应的分子机理复杂,已经发现绿脓杆菌培养上清中有多种因子具有致炎活性,比如粘附素、菌毛蛋白、鞭毛蛋白、绿脓菌素等,但是从现阶段发表的文献来看,多数研究仅仅观察到了这些细菌产物对上皮细胞的致炎作用,而缺乏细胞炎症反应信号传递机制的深入探讨。

在绿脓杆菌分泌的毒力因子中,有一类低分子(分子量 200 Da 左右)吩嗪类物质(phenazines),现已发现四种,包括:phenazine-1-carboxylic acid (PCA)、1-hydroxy-5-methylphenazine (pyocyanin)、1-hydroxy-phenazine (1-HP)和 phenazine-1-carboxamide (PCN)。其中绿脓菌素(pyocyanin)的含量最为丰富,在绿脓杆菌感染病人的痰液中绿脓菌素浓度高达 $100\mu\text{mol/L}$ (大约 $20\mu\text{g/mL}$)^[7]。研究显示绿脓菌素是重要的细菌毒力因子,可使呼吸道纤毛摆动逐步降低,最后发展为广泛的纤毛停滞,导致上皮损伤^[8],同时还会降低支气管粘液流动速度,有利于绿脓杆菌定植于呼吸道^[9]。Massion 等人的实验最早提示绿脓杆菌培养上清中有小分子物质是细菌产生的主要致炎活性成分,可刺激上皮细胞 IL-8 表达^[10]。以后有报导显示纯化的绿脓菌素可以刺激多株呼吸道上皮细胞以及原代培养的上皮细胞表达 IL-8^[4]。Kevin 等也发现,绿脓杆菌培养上清中引起呼吸道上皮细胞株 IL-8 升高的主要成分为绿脓菌素^[11]。把绿脓菌素注入动物呼吸道后,支气管肺泡灌洗液中的中性粒细胞(PMNs)显著增多^[12]。绿脓菌素刺激炎症反应是否涉及受体分子,以及炎症的细胞内信号传递途径至今仍不清楚。

IL-8 是吸引 PMNs 到感染部位的最重要的趋化细胞因子。IL-8 基因表达调控研究揭示,在基因上游调控序列中,起关键作用的是转录激活因子 AP-1 及 NF- κ B 的结合基序^[13]。我们在观察到绿脓杆菌培养上清及绿脓菌素刺激呼吸道上皮细胞株 A549、SPC-A-1 IL-8 基因表达的基础上,进一步探讨了激活 IL-8 基因的信号通路,结果提示在绿脓菌素刺激下,丝裂原激活蛋白激酶(MAPKs)及 NF- κ B 两条通路同时被激活。MAPKs 为一类丝/苏氨酸蛋白激酶,是细胞炎症信号传导通路的重要介质,当细胞受到刺激后,MAPKs 发生磷酸化而被激活,转移到细胞核内,发挥其蛋白激酶活性,促使转录激活因子 AP-1 的激活。现已发现 MAPK 家族有多个成员,其中细胞外信号调节激酶(ERK1/2)、c-Jun NH₂-末端激酶(JNK)和 p38 MAPK 最受关注。本研究使用 Western blot 检测方法,观察到绿脓菌素可使细胞内 MAPKs 发生磷酸化活化的直接证据;进一步采用 MEK1/2 阻断剂 U0126 以及 p38 MAPK 阻断剂 SB203580,发现它们均可在一定程度上抑制绿脓菌素对 IL-8 的上调表达。NF- κ B 是细胞炎症反应重要的基因转录激活因子,在调控细胞 IL-8 的转录表达中具有至关重要的作用。炎症信号激活 I κ B 激酶复合体(IKK),使 I κ B 发生磷酸化并降解,NF- κ B 解离并由胞浆移至核内,与特异的 DNA 序列相结合,调节相应靶基因,包括 IL-8 的转录。本次试验首次观察到绿脓菌素可使细胞内 I κ B- α 发生降解,提示 NF- κ B 通路也参与了绿脓菌素调节细胞 IL-8 表达的过程。我们在预实验中,用不含绿脓菌素的培养液孵育细胞,观察不同时间细胞蛋白 I κ B- α 和 MAPKs 的动态表达,未发现有明显变化。提示绿脓菌素可以特异的激活 MAPKs 及 NF- κ B 信号传导通路,从而调节 IL-8 的表达。

值得关注的是,很多细菌产物刺激细胞的炎症反应都有特异的受体介导。本实验观察到绿脓菌素激活 NF- κ B 及 MAPKs 这两条通路,它们都处在炎症信号传递的下游,绿脓菌素炎症信号的上游涉及哪些分子,细胞膜上(或细胞内)有没有绿脓菌素的特异受体分子,有必要作进一步的探讨。随着对绿脓杆菌感染炎症机理的深入了解,我们对疾病发病机制的认识将更加深刻,并为预防和控制绿脓杆菌引起机体炎症反应提供新的思路,炎症信号的阐明也将为研究和开发调控炎症新药(包括基因治疗)提供更多的靶点。

参 考 文 献

- [1] Buret A , Cripps A W . The immunoevasive activities of *Pseudomonas aeruginosa* relevance of cystic fibrosis . *Am Rev Respir Dis* , 1993 , **148** :793 – 805 .
- [2] Kunkel S L , Standiford T , Kasahara K , et al . Interleukin-8 (IL-8) : the major neutrophil chemotactic factor in the lung . *Exp Lung Res* , 1991 , **17** (1) :17 – 23 .
- [3] Emily D , Heather J Z , Ruth B , et al . Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8 . *J Clin Invest* , 1995 , **96** :2204 – 2210 .
- [4] Denning G M , Wollenweber L A , Railsback M A , et al . *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells . *Infect and Immun* , 1998 , **66** (12) :5777 – 5784 .
- [5] Ras G J , Anderson R , Taylor G W , et al . Proinflammatory interactions of pyocyanin and 1-hydroxyphenazine with human neutrophils in vitro . *J Infect Dis* , 1990 , **162** :178 – 185 .
- [6] David W , John M D , Robert W , et al . Purification and structural analysis of pyocyanin and 1-hp . *Eur J Biochem* , 1986 , **159** :309 – 313 .
- [7] Wilson R , Sykes D A , Watson D , et al . Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium . *Infect Immun* , 1988 , **56** (9) :2515 – 2517 .
- [8] Wilson R , Pitt T , Taylor G , et al . Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia in vitro . *J Clin Invest* , 1987 , **79** :221 – 229 .
- [9] Munro N C , Rarker A , Rutman A , et al . Effect of pyocyanin and 1-hydroxyphenazine on in vivo tracheal mucus velocity . *J Appl Physiol* , 1989 , **67** (1) :316 – 323 .
- [10] Massion P P , Inoue H , Eisenstat J R , et al . Novel *Pseudomonas* product stimulates interleukin-8 release by airway epithelial cells in vitro . *J Clin Invest* , 1994 , **93** :26 – 32 .
- [11] Kevin G L , Kimber L M , Gereke M D . Small molecular weight secretory factors from *Pseudomonas aeruginosa* have opposite effects on IL-8 and RANTES expression by human airway epithelial cells . *Am J Respir Cell Mol Biol* , 2001 , **25** :186 – 195 .
- [12] Laredo I T , Sabater J R , Ahmed A , et al . Mechanism of pyocyanin- and 1-hydroxyphenazine-induced lung neutrophilia in sheep airways . *J Appl Physiol* , 1998 , **85** (6) :2298 – 2304 .
- [13] Hoffmann E , Dittrich B O , Holtmann H , et al . Multiple control of interleukin-8 gene expression . *J Leukoc Biol* , 2002 , **72** (5) :847 – 855 .

Involvement of MAPKs and NF- κ B pathways in *Pseudomonas* pyocyanin-induced interleukin-8 expression by human airway epithelial cells

FENG Yan¹ WANG Fang¹ LI Xiang² WANG Bo-yao¹ WU Qi^{1*}

(¹ Research Unit of Infection and Immunity , West China School of Preclinical and Forensic Medicine , Sichuan University , Chengdu 610041 , China)

(² Department of Urology , West China Hospital , Sichuan University , Chengdu 610041 , China)

Abstract : To investigate the molecular mechanisms of signaling transduction by which *Pseudomonas* pyocyanin induces IL-8 expression in human airway epithelial cells , A549 and SPC-A-1 cells were challenged with *P. aeruginosa* conditioned medium or pyocyanin . Chemokine interleukin-8 (IL-8) release from the challenged cells was measured by ELISA , and Western blot was performed to analyze the degradation of I κ B- α and the phosphorylation of MAPKs (mitogen-activated protein kinases) in the extracts from cells stimulated with pyocyanin . Both of *P. aeruginosa* conditioned medium and pyocyanin remarkably increased IL-8 expression by human airway epithelial cells . Degradation of I κ B- α was found shortly after A549 cells were stimulated with pyocyanin . Western hybridization analysis also demonstrated that pyocyanin caused phosphorylation of MAPKs including ERK1/2 , p38 and JNK in A549 cells . Pretreatment of A549 cells with U0124 (10 μ mol/L) , a selective inhibitor of MEK1/2 (ERK1/2 kinase) or with SB203580 (10 μ mol/L) , a specific inhibitor of p38 MAPK , diminished the pyocyanin-induced IL-8 production . These findings suggest that *Pseudomonas* pyocyanin can increase IL-8 expression by human airway epithelial cells through MAPKs signaling pathways and the activation of NF- κ B is also involved in this process .

Key words : Airway epithelial cells , Pyocyanin , MAPKs , NF- κ B