

脂氧素对粒细胞集落刺激因子表达的影响及其机制初探

周晓燕 张力 吴萍 熊维 李咏生 叶笃筠*

(华中科技大学同济医学院病理生理学系, 武汉 430030)

摘要 体外培养小鼠巨噬细胞 RAW264.7, 实验分为空白组、脂多糖(LPS)组(1 mg/L LPS)及脂氧素 A₄ (LXA₄)处理组(1 mg/L LPS 与 0.1~1 000 nmol/L LXA₄ 共同温育)。处理预设时间后, 实时荧光定量聚合酶链反应和酶联免疫吸附实验分别检测粒细胞集落刺激因子(G-CSF)基因表达和蛋白质分泌水平, 免疫印迹法检测 IκB_α 降解和 NF-κB 转位情况, 荧光素酶报告质粒检测 NF-κB 转录活性。结果表明: LPS 诱导 G-CSF 表达($P<0.01$), LXA₄ 抑制 G-CSF 基因表达和蛋白质分泌, 其中 10 nmol/L LXA₄ 作用最明显(抑制率为 39.8%) ($P<0.01$); 10 nmol/L LXA₄ 明显抑制 IκB_α 降解($P<0.05$), NF-κB 转位($P<0.05$)以及 NF-κB 的转录活性($P<0.05$)。这提示 LXA₄ 可能通过抑制 NF-κB 的转位和转录活性而抑制 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞分泌 G-CSF。

关键词 脂氧素; 粒细胞集落刺激因子; 脂多糖; 巨噬细胞; NF-κB

脂氧素(lipoxins, LXs)是花生四烯酸通过跨细胞方式(transcellular pathway)经脂加氧酶(lipoxygenase)代谢途径的产物, 业已证实 LXs 是机体最重要的内源性抗炎介质之一^[1-3]。而新近研究发现粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)除趋化中性粒细胞, 促进细胞增殖、分化、成熟之外, 还能减少其凋亡、诱导活性氧生成^[4,5]。G-CSF 在炎症发生、发展过程中扮演的重要角色日益凸现。那么, LXs 的抗炎作用与 G-CSF 是否存在关联? 若存在关联, 它们又是如何对话呢? 本文以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激巨噬细胞建立炎症模型, 研究了 LXs 与 G-CSF 表达之间的关系, 旨在揭示 LXs 的抗炎作用与 G-CSF 的对话机制。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640 培养液为 Gibco 公司产品, 胎牛血清购自浙江三利生物制品厂, LPS(*Escherichia coli* serotype 0111:B4)购自 Sigma 公司, TRIzol 和 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, 逆转录试剂、荧光素酶检测试剂盒、β-半乳糖苷酶检测试剂盒购自 Promega 公司, SYBR-green I Master Mix 购自 ABI 公司, 引物均由上海赛百盛基因技术有限公司合成, G-CSF 检测试剂盒购自 Biosource, NF-κBp65 和 IκB_α 一抗购自 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶标记的二抗购自 Pierce 公司, NF-κB 荧光素酶报告质粒为

Clontech 公司产品, 脂氧素 A₄(lipoxin A₄, LXA₄)购自 Cayman 公司

1.2 细胞培养与分组

小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 (购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所)用 RPMI1640 培养液培养在 6 孔培养板中, 培养液中加入 10% 的胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素, 细胞培养在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中。按实验设计将培养细胞分成 3 组(每组重复 6 次): (1)空白对照组: 用生理盐水处理作为空白对照组 (2) LPS 处理组: 1 mg/L LPS 处理 (3) LXA₄ 处理组: 1 mg/L LPS 与不同剂量 LXA₄ 共同处理。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测 G-CSF 基因表达水平

1.3.1 常规方法提取总 RNA 并逆转录为 cDNA 各组细胞在 37 °C、5% CO₂ 下继续培养 4 h 后, 采用 TRIzol 法提取各样品总 RNA, 紫外分光光度计测定纯度定量后取 4 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 反应 反应体系为 25 μl, 包括 12.5 μl 2×SYBR-green I Master Mix, 5 μmol/L 上下游引物各 1 μl, 2.5 μl cDNA, 无菌水补足 25 μl。反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 然后 95 °C 15 s、60 °C 1 min 反应 40 个循环。反应设立内对照 GAPDH。反应在 ABI Prism 7000 荧光定量 PCR 仪上进行, 每

收稿日期: 2006-09-22 接受日期: 2007-01-10

国家自然科学基金资助项目(No.30570726)

* 通讯作者。Tel: 027-83650562, E-mail: yedy@mails.tjmu.edu.cn

个样本进行 *G-CSF* 基因、*GAPDH* 基因扩增时均做 4 次重复。*G-CSF* 基因与 *GAPDH* 基因的拷贝数之比,作为 *G-CSF* 基因的相对表达量用于分析。

1.3.3 最低循环数值(Ct)比较法计算 *G-CSF* 基因的相对拷贝数 应用 $\Delta\Delta Ct$ 法,与内对照 *GAPDH* 基因比较可以得出 *G-CSF* 基因的相对表达量, ΔCt 代表每个样本 4 次重复的平均 Ct 值, $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{GAPDH}(\text{对照样本}) - \Delta Ct_{GAPDH}(\text{处理样本})] - [\Delta Ct_{G-CSF}(\text{对照样本}) - \Delta Ct_{G-CSF}(\text{处理样本})]$, *G-CSF* 基因的相对拷贝数等于 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [6,7]

1.3.4 引物序列 *G-CSF*: 上游引物为 5'-CATGGC-TCAACTTTCTGCCCA-3', 下游引物为 5'-TAGGTG-GCACACAAGTCTC-3'。 *GAPDH*: 上游引物为 5'-CCTGCACCACCAACTGCTTA-3', 下游引物为 5'-TCATGAGCCCTTCCACAATG-3'。

1.4 ELISA 检测培养上清液中 *G-CSF* 水平

各组细胞处理预设时间后,收集培养上清液,严格按照试剂盒说明书的要求依次加入样品或标准品、生物素化抗体、酶结合物工作液、显色液、显色终止液,最后酶标仪 450 nm 测 A_{450} 值。

1.5 免疫印迹法检测 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 表达

细胞裂解液提取胞浆蛋白或核蛋白,BCA法测定蛋白质浓度。取 40 μg 总蛋白样品煮沸变性后,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,随后电转移至硝酸纤维素膜上,置于 5% 脱脂奶粉中室温封闭 1 h。加入 1:200 稀释的 $\text{NF-}\kappa\text{Bp65}$ 或 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜, TBST (TBS+0.05% Tween-20)洗膜,置 1:8 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗中 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, TBST 洗膜。将膜与 ECL 反应 5 min 后,曝光于 X 光胶片上,显影、定影,扫描后图像分析。

1.6 报告质粒荧光素酶检测

24 孔板细胞长至 80% 密度时,转染 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 报告质粒或空载体,并同时转染 β -半乳糖苷酶报告质粒作为内参照,转染后 6 h 更换培养液并加入 LPS 或/和 LXA_4 温育 24 h。弃培养液,加入裂解缓冲液,将裂解产物转入离心管中,涡旋振荡 15 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 2 min,取上清液,一部分上清液加入荧光素酶检测试剂检测荧光素酶活性,另取一部分与 β -半乳糖苷酶检测试剂混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3 h 后 420 nm 测 β -半乳糖苷酶活性。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件进行数据处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,差异显著性检验采用单因素方差分析。

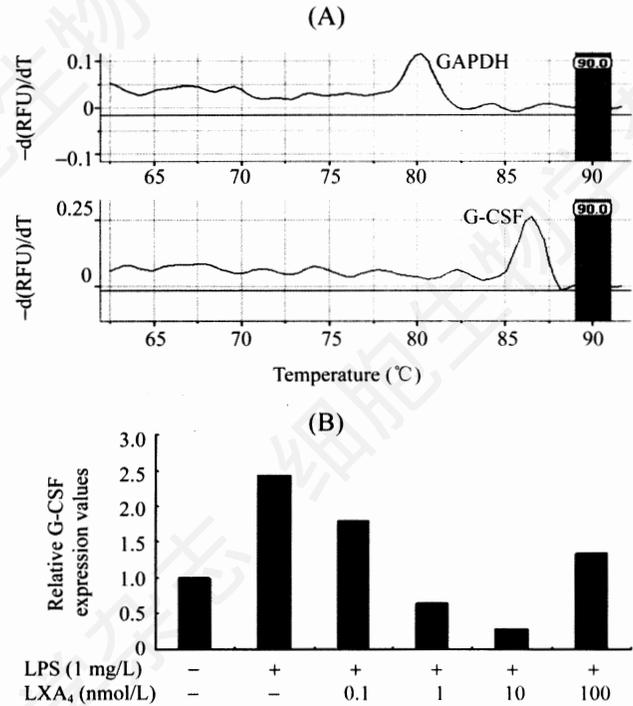


Fig.1 LXA_4 showed dose-dependent impairment of LPS-induced *G-CSF* gene expression

A: the *GAPDH* and *G-CSF* melting curve; B: the relative quantity of *G-CSF*.

2 结果

2.1 LXA_4 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 *G-CSF* 基因表达的影响

熔解曲线显示, *GAPDH* 和 *G-CSF* 的峰值分别在 80.5 $^{\circ}\text{C}$ 、86.6 $^{\circ}\text{C}$, 峰形锐利, 并且其他位置未见明显波形(图 A)。说明扩增产物为特异性产物, 无引物二聚体及非特异性产物产生。定量结果显示 LPS 上调 *G-CSF* 约 2.5 倍, 而 LXA_4 抑制 LPS 诱导 *G-CSF* 表达, 以 10 nmol/L LXA_4 的抑制作用最突出, 其表达量几乎仅为 LPS 刺激组的 1/10 (图 B)。

2.2 LXA_4 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌 *G-CSF* 的影响

ELISA 结果显示, 1 mg/L LPS 明显诱导细胞分泌 *G-CSF* ($P < 0.01$), LXA_4 抑制 LPS 诱导 *G-CSF* 分泌, 其中 10 nmol/L LXA_4 抑制作用最明显(抑制率为 39.8%) ($P < 0.01$) (图 2A), 10 nmol/L LXA_4 处理细胞 2 h 出现抑制 *G-CSF* 分泌的效果(图 2B)。

2.3 LXA_4 抑制 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 降解和 $\text{NF-}\kappa\text{Bp65}$ 转位

$\text{NF-}\kappa\text{B}$ 是 *G-CSF* 的转录激活因子, 我们进一步研究了 LXA_4 对 *G-CSF* 的影响是否通过抑制 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 而

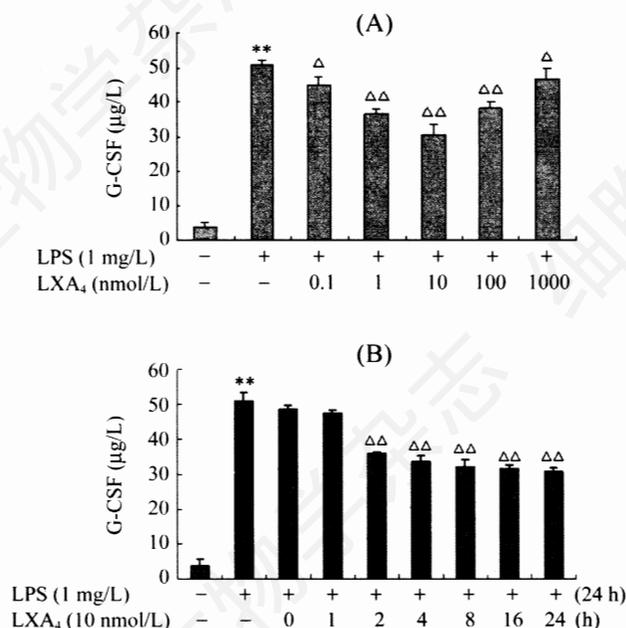


Fig.2 LX A₄ showed dose-dependent impairment of LPS-induced G-CSF secretion

A: dose-dependent effect of LX A₄ on LPS-induced G-CSF secretion; B: time effect of LX A₄ on LPS-induced G-CSF secretion. ** $P < 0.01$ versus control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, versus LPS group.

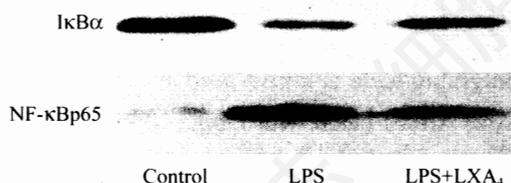


Fig.3 LX A₄ blocked LPS-induced I κ B α degradation and NF- κ B translocation

实现。免疫印迹分析发现 LPS 诱导绝大多数 I κ B α 降解, 而 LX A₄ 明显抑制 I κ B α 降解(图 3)。由于 I κ B α 是 NF- κ B 的抑制蛋白, I κ B α 抑制 NF- κ B 由胞浆移位至胞核, 我们提取核蛋白并利用 NF- κ B p65 的抗体检测 NF- κ B 的转位情况, 结果发现 LX A₄ 显著抑制 LPS 诱导 NF- κ B 在胞核聚集(图 3)。

2.4 LX A₄ 对 LPS 激活的 RAW264.7 细胞 NF- κ B 转录活性的影响

转染带有 NF- κ B 结合位点的荧光素酶报告质粒发现, LX A₄ 剂量依赖性地抑制 LPS 诱导的 NF- κ B 转录活性, 而对空载体的基础荧光素酶活性无明显影响(图 4)。

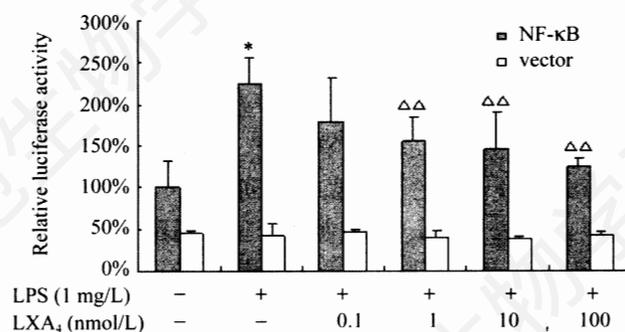


Fig.4 LX A₄ inhibited LPS-induced NF- κ B transcriptional activity

* $P < 0.05$, versus control group; $\Delta\Delta P < 0.01$, versus LPS group.

3 讨论

众所周知, 中性粒细胞是主要的炎症细胞之一。中性粒细胞在炎症局部通过吞噬和免疫作用而发挥防御效应之外, 还可以通过释放蛋白水解酶、化学介质、氧自由基等损伤组织。而主要由巨噬细胞分泌的 G-CSF 是调节中性粒细胞生长、成熟的关键造血生长因子。G-CSF 与受体结合后, 使 G-CSFR 同源或异源二聚化而活化, 进而激活 JAK/STAT、Ras/MAPK 等多条信号通路, 实现其多种生理效应。基于 LXs 强大的抗炎作用及 G-CSF、中性粒细胞在炎症中的枢纽作用, 本研究从基因和蛋白质水平观察了 LXs 对 G-CSF 的影响。结果发现, LX A₄ 抑制 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞 G-CSF 表达和分泌(图 1, 图 2), 这提示抑制 G-CSF 产生可能是 LXs 发挥其抗炎效应的途径之一。而有趣的是, 我们发现 LX A₄ 对 G-CSF 表达和分泌的抑制作用不是随着 LX A₄ 浓度的增加而增强, 而以 10 nmol/L LX A₄ 的抑制作用最强。这提示 LX A₄ 可能并非通过单一途径影响 G-CSF 的表达和分泌或者 10 nmol/L LX A₄ 更接近机体的生理浓度而成为体外实验的最佳作用浓度。

NF- κ B 广泛存在于各类细胞, 是调控众多炎症和免疫相关基因表达的关键性转录因子^[8]。文献报道, NF- κ B 是 G-CSF 的转录激活因子^[9-11]。那么 LXs 是否通过调节 NF- κ B 而影响 G-CSF 的表达呢? 由于 10 nmol/L LX A₄ 的抑制作用最显著, 我们研究了 10 nmol/L LX A₄ 对 NF- κ B p65 转位的影响。结果表明, LPS 显著促进 NF- κ B p65 转位, 而 10 nmol/L LX A₄ 明显抑制 LPS 诱导 NF- κ B p65 转位(图 3)。在静息状态下, NF- κ B 以一种无活性的形式与其抑制蛋白 I κ B 结合存

在于胞浆中。LPS 刺激时, I κ B 被磷酸化而降解, NF- κ B 由胞浆移位至胞核, 启动炎症相关基因的转录^[12]。I κ B α 是 NF- κ B 的抑制蛋白, 其降解水平直接影响 NF- κ B 转位情况。于是, 我们观察了 10 nmol/L LXA₄ 如何影响 LPS 诱导的 I κ B α 降解。研究发现, LXA₄ 明显抑制 LPS 诱导 I κ B α 降解(图 3)。我们还利用带有 NF- κ B 结合位点的荧光素酶报告质粒直接检测了 LXA₄ 对 NF- κ B 转录活性的影响, 结果证实 LXA₄ 呈剂量依赖性抑制 NF- κ B 的转录活性(图 4)。这进一步揭示 LXA₄ 抑制 NF- κ B 是其调节 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞表达 G-CSF 的途径之一。而 LXA₄ 呈剂量依赖性抑制 NF- κ B 的转录活性似乎与上文 LXA₄ 对 G-CSF 的抑制作用并不是随着浓度的增加而增强相互矛盾, 实际上这进一步说明 LXA₄ 能够通过多条途径调节 G-CSF 的表达和分泌。

综上所述, 本研究发现 LXs 显著抑制 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞表达和分泌 G-CSF, 抑制 NF- κ B

转位及转录活性是其重要机制之一。LXs 可能作为 NF- κ B 活化的抑制剂, 调节细胞内 NF- κ B 的转录活性, 使胞内信号通路活性降低而减轻炎症反应。但 LXs 影响 G-CSF 表达对巨噬细胞功能有何影响? LXs 还可以通过哪些机制影响 G-CSF 的表达? 目前还不得而知, 这也是我们将关注和研究的问题。

参考文献 (References)

- [1] 张 力等. 生命的化学, 2004, 24: 61
- [2] Ariel A *et al.* *J Immunol*, 2003, 170: 6266
- [3] Fierro IM *et al.* *Braz J Med Biol Res*, 2001, 34: 555
- [4] 王秋鹏等. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21: 390
- [5] Zhu QS *et al.* *Blood*, 2006, 107: 1847
- [6] Livak KJ *et al.* *Method*, 2001, 25: 402
- [7] Yuan JS *et al.* *BMC Bioinformatics*, 2006, 7: 85
- [8] Kim GY *et al.* *J Immunol*, 2005, 174: 8116
- [9] Dunn SM *et al.* *Blood*, 1994, 83: 2469
- [10] Bar-Yehuda S *et al.* *Exp Hematol*, 2002, 30: 1390
- [11] Joyce D *et al.* *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001, 12: 73
- [12] Akira S *et al.* *Nat Rev Immunol*, 2004, 4: 499

Effects of Lipoxin A₄ on Expression of G-CSF and Possible Mechanisms

Xiao-Yan Zhou, Li Zhang, Ping Wu, Wei Xiong, Yong-Sheng Li, Du-Yun Ye*

(Department of Pathophysiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract To explore the effects of lipoxin A₄ (LXA₄) on granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) expression in RAW264.7 macrophages and the possible mechanisms. After treated with 1 mg/L lipopolysaccharide (LPS) in the absence or presence of LXA₄ (0.1–1 000 nmol/L), the cells were harvested and G-CSF gene expression levels were assessed by real time PCR, G-CSF protein concentrations were determined by ELISA, I κ B α degradation and NF- κ B translocation were detected through Western blot, NF- κ B transcriptional activities were tested by transfections and luciferase activities assay. Results demonstrated that LPS increased G-CSF gene and protein expression levels, LXA₄ inhibited the effects of LPS, and 10 nmol/L LXA₄ restrained LPS-induced I κ B α degradation, NF- κ B translocation and NF- κ B transcriptional activity. In a word, LXA₄ controlled LPS-induced G-CSF production through inhibition NF- κ B activity in RAW264.7 macrophages.

Key words lipoxin; G-CSF; lipopolysaccharide; macrophages; NF- κ B

Received: September 22, 2006 Accepted: January 10, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30570726)

*Corresponding author. Tel: 86-27-83650562, E-mail: yedy@mails.tjmu.edu.cn