

[文章编号] 1000-4718(2008)11-2224-06

PKC/Raf-1/NF- κ B 信号通路在低氧诱导大鼠单核细胞表达 TNF- α 中的作用*

徐智¹, 吴国明^{1△}, 钱桂生¹, 王兴胜¹, 陈维中¹, 薛桥², 王士雯²(¹ 第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所, 重庆 400037; ² 解放军 301 医院老年心血管病研究所, 北京 100853)

[摘要] 目的: 研究 PKC/Raf-1/NF- κ B 信号通路在低氧诱导大鼠外周血单核细胞(PBMCs)肿瘤坏死因子 α (TNF- α)表达中的作用, 探讨低氧与全身炎症反应综合征(SIRS)的关系, 为进一步研究老年多器官功能障碍综合征(MODSE)的肺启动机制奠定基础。方法: 采用明胶法分离大鼠外周血单核细胞, 分为 chelerythrine + 低氧组、forskolin + 低氧组和单纯低氧组。Chelerythrine + 低氧组和 forskolin + 低氧组细胞在低氧前分别予 10 μ mol/L chelerythrine 和 50 μ mol/L forskolin 预处理。然后各组均于低氧条件下(3% O₂, 5% CO₂, 92% N₂)培养 0、1、3、6、9、12、24 h 后, 收集细胞及培养液上清, 分别采用 PKC、Raf 活性检测试剂盒、电泳迁移分析法(EMSA)、逆转录 PCR(RT-PCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 PKC、Raf-1、NF- κ B 活性及 TNF- α 表达量。结果: 低氧 1-9 h, PKC、Raf-1 活性、NF- κ B 结合活性及 TNF- α 表达量显著高于正常对照组($P < 0.01$)。低氧后 1-24 h, PKC、Raf-1 活性、NF- κ B 结合活性与 TNF- α mRNA 和蛋白表达水平间呈显著正相关($P < 0.01$, $P < 0.05$)。10 μ mol/L chelerythrine 可显著抑制低氧诱导的 PKC、Raf-1、NF- κ B 活性升高和 TNF- α 表达。50 μ mol/L forskolin 可显著抑制低氧诱导的 Raf-1、NF- κ B 活性升高及 TNF- α 表达。结论: 低氧可显著增强大鼠外周血单核细胞的 PKC、Raf-1 活性及 NF- κ B 结合活性, 并可诱导其产生大量的促炎症因子 TNF- α , 这些变化可能与急性呼吸窘迫综合征(ARDS)时血浆中大量促炎症因子持续存在密切相关。

[关键词] 低氧; NF- κ B; 肿瘤坏死因子; PKC/Raf-1/NF- κ B 信号通路

[中图分类号] R364.4; R392.12; R392.13 **[文献标识码]** A

Role of PKC/Raf-1/NF- κ B signal cascade in expression of TNF- α in rat monocytes exposed to hypoxia

XU Zhi¹, WU Guo-ming¹, QIAN Gui-sheng¹, WANG Xing-sheng¹, CHEN Wei-zhong¹, XUE Qiao², WANG Shi-wen²

(¹The Institute of Respiratory Disease of PLA, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China; ²The Institute of Geriatric Cardiology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China. E-mail: xu_zhi999@163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the role of PKC/Raf-1/NF- κ B signal cascade in the expression of TNF- α in rat peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) exposed to hypoxia, and to explore the relationship between hypoxia and system inflammation response syndrome(SIRS) for the further study of the primordial role of lung in the pathogenesis of the multiple organ dysfunction syndrome in the elderly (MODSE). **METHODS:** Purified rat PBMCs were divided randomly into three groups: chelerythrine + hypoxia group, forskolin + hypoxia group and hypoxia group. The chelerythrine + hypoxia group and forskolin + hypoxia group were pretreated with 10 μ mol/L chelerythrine and 50 μ mol/L forskolin respectively before being exposed to hypoxia. Then three groups were exposed to hypoxia (3% O₂, 5% CO₂, 92% N₂) for 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 h. The PKC and Raf-1 activity were assayed by PKC kit and Raf-1 kit, respectively. The NF- κ B binding activity was detected by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The expression of TNF- α was detected by reverse transcriptase PCR(RT-PCR) and enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). **RESULTS:** The activities of PKC, Raf-1 and NF- κ B and the expression of TNF- α increased significantly during 1-9 h of hypoxic exposure ($P < 0.01$). There were significant positive correlations between the activities of PKC, Raf-1 and NF- κ B and the expression

[收稿日期] 2007-08-01 [修回日期] 2008-03-05

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30500230)

△通讯作者 Tel:023-68774603

of TNF- α ($P < 0.01, P < 0.05$). Chelerythrine at concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$ suppressed the hypoxia-induced PKC, Raf-1 and NF- κB activation and the expression of TNF- α . Forskolin at concentration of 50 $\mu\text{mol/L}$ suppressed the hypoxia-induced Raf-1 and NF- κB activation and the expression of TNF- α . **CONCLUSION:** Hypoxia enhances the activities of PKC, Raf-1 and NF- κB in rat PBMCs, and up-regulates the expression of TNF- α in mRNA and protein levels subsequently, leading to the existence of massive pro-inflammatory factors persistently in the blood plasma of acute respiratory distress syndrome (ARDS) patients.

[KEY WORDS] Hypoxia; NF- κB ; Tumor necrosis factor; PKC/Raf-1/NF- κB signal pathway

临床和实验研究表明,急性肺损伤(acute lung injury, ALI)和急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory disease syndrome, ARDS)与多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的发生密切相关,因此有学者提出了 MODS 的肺启动学说^[1]。该学说认为 ALI/ARDS 不仅是 MODS 的重要组成部分,多数情况下也是 MODS 的始动因素^[2]。目前关于 MODS 的肺启动机制尚未完全阐明。ARDS 发展为 MODS 的过程中可能涉及多种病理生理机制,其中低氧和 SIRS 作为 ARDS 主要的病理生理变化可能对 MODS 的发生发展起着重要的作用。顽固性低氧血症不仅是 ARDS 的重要特征,也是继发多脏器损害的重要发病机制。低氧导致器官功能损害除与细胞能量代谢障碍、代谢性酸中毒有关外^[3],还可能与低氧激活炎症细胞,促使炎症因子释放有关^[4]。我们前期的研究工作表明,低氧可通过激活 NF- κB ,从而启动 TNF- α 的基因转录和表达。但低氧激活 NF- κB 的确切信号通路尚未明了。本研究通过观察低氧培养的大鼠外周血单核细胞(PBMCs) PKC、Raf-1、NF- κB 活性及 TNF- α 表达的变化规律,旨在探讨低氧诱导大鼠 PBMCs 表达 TNF- α 的信号通路及其调控机制,为 MODS 的临床防治探索新的治疗策略。

材 料 和 方 法

1 试剂及仪器

RPMI-1640(Gibco);大鼠淋巴细胞分离液(上海试剂厂);Oligo(dT)、dNTP、MMLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂、Taq DNA 酶、PKC 活性检测试剂盒(Promega);chelerythrine(Sigma);抗大鼠 Raf-1 抗体、Raf 活性检测试剂盒(Upstate);TNF- α ELISA 试剂盒(晶美生物公司);第2代 DIG Gel Shift 试剂盒、Tripure(Roche);其它试剂为国产分析纯。PTC-200 DNA 扩增仪(MJ);Alphamager 2200 凝胶成像分析系统(Alpha. Innotech);酶联免疫检测仪 HTS 7000(PE);O₂-Elerktrodenset 型低氧恒温培养箱(Heraeus)。Wistar 大鼠(雌雄不拘,由第三军医大学动物实验中心提供)。

2 大鼠 PBMCs 分离培养

参照文献^[5]方法进行。调整细胞终浓度至 5×10^8 cells/L。

3 细胞低氧处理和实验分组

采用数字随机表法将 147 瓶大鼠 PBMCs 随机分为:低氧 0、1、3、6、9、12、24 h 组,chelerythrine + 低氧 0、1、3、6、9、12、24 h 组, forskolin + 低氧 0、1、3、6、9、12、24 h 组($n = 7$)。Chelerythrine + 低氧组和 forskolin + 低氧组细胞在低氧前分别予 10 $\mu\text{mol/L}$ chelerythrine 和 50 $\mu\text{mol/L}$ forskolin 预处理。然后各组均于低氧条件下(3% O₂, 5% CO₂, 92% N₂)培养 0、1、3、6、9、12、24 h 后,500 r/min 离心收集细胞和培养液上清备用。在抽提细胞总 RNA 和核蛋白前采用台盼蓝拒染法做细胞活力检测,各组细胞拒染率均 >95%。

4 TNF- α mRNA 表达量的检测

采用 Tripure 一步法提取大鼠 PBMCs 总 RNA, 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定,紫外分光光度计测定其纯度并定量。RT-PCR 采用二步法,先取总 RNA 3 μg 逆转录为 cDNA,然后进行 PCR 扩增。大鼠 TNF- α 、 β -actin 引物采用引物设计软件 Primer Premier 5.0 自行设计:TNF- α (产物长度 295 bp):正义链 5'-TAC TGA ACT TCG GGG TGA TTG GTC C-3',反义链 5'-CAG CCT TGT CCC TTG AAG AGA ACC-3'; β -actin(产物长度 587 bp):正义链 5'-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3',反义链 5'-AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C-3'。引物由上海基康生物技术有限公司合成。

4.1 PCR 扩增条件 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,接着 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,进行 35 个循环,末次循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

4.2 PCR 产物的半定量分析 PCR 后取 10 μL 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪扫描成像,采用 Alpha. Innotech 图像软件测定各条带积分吸光度值(以灰度表示)。以同一样品的 TNF- α 和 β -actin 产物条带积分吸光度值之比($A_{\text{TNF-}\alpha}/A_{\beta\text{-actin}}$)作数据分析,以此反映 TNF- α 的 mRNA 表达程度。

5 细胞培养上清中 TNF-α 浓度检测

采用 ELISA 法检测,具体方法按试剂盒说明进行。

6 PKC 活性检测

采用冰上裂解及离心法提取细胞蛋白,考马斯亮蓝法测定其蛋白浓度后 -70 °C 保存备用。采用 PKC 活性检测试剂盒检测 PKC 活性,具体步骤按试剂盒说明进行。

7 Raf-1 活性检测

免疫沉淀 Raf-1,采用 Raf 试剂盒检测其活性,具体步骤按试剂盒说明进行。以同位素检测单位每分钟计数(counts · min⁻¹)代表其活性。

8 NF-κB 活性检测

核蛋白提取参照文献进行^[6]。将核蛋白提取液蛋白浓度调至 0.5 g/L。采用第 2 代 DIG Gel Shift 试剂盒检测 NF-κB 活性,具体步骤按试剂盒说明进行,结果用 X 射线胶片显影,图像扫描存入计算机后用图像软件测定各条带积分吸光度值(以灰度表

示),以积分灰度值表示 NF-κB 的活性变化。

9 统计学处理

数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS10.0 进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析(SNK 法),相关性分析采用双因素相关分析(Pearson 法)。

结 果

1 大鼠 PBMCs TNF-α mRNA 表达的变化

单纯低氧 1-24 h, TNF-α mRNA 表达量先升后降,其峰值见于低氧后 3 h,此后 TNF-α mRNA 表达量逐渐下降,至低氧 12 h 其水平已与低氧前相当,低氧 24 h 其水平显著低于低氧前水平。经 PKC 抑制剂 chelerythrine 或 Raf-1 抑制剂 forskolin 处理后,低氧 1-24 h TNF-α mRNA 表达量无明显升高。低氧 1-9 h, 2 组 TNF-α mRNA 表达量均显著低于同时点单纯低氧组,见表 1 和图 1。

表 1 各组大鼠 PBMCs TNF-α mRNA 表达变化

Tab 1 The expressions of rat PBMCs TNF-α mRNA in each group ($A_{TNF-\alpha}/A_{\beta-actin}$, $\bar{x} \pm s$, $n=7$)

Group	PBMCs TNF-α mRNA						
	0 h	1 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
Hypoxia	0.45 ± 0.09	0.66 ± 0.10**	0.91 ± 0.13**	0.87 ± 0.12**	0.65 ± 0.09**	0.37 ± 0.08	0.37 ± 0.07*
Chelerythrine + hypoxia	0.44 ± 0.09	0.43 ± 0.09###	0.40 ± 0.07###	0.37 ± 0.07###	0.37 ± 0.06***	0.36 ± 0.01**	0.34 ± 0.01**
Forskolin + hypoxia	0.43 ± 0.08	0.42 ± 0.09###	0.40 ± 0.06###	0.38 ± 0.08###	0.36 ± 0.07***	0.35 ± 0.05**	0.32 ± 0.08**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs hypoxia 0 h group; ### $P < 0.01$ vs hypoxia group.

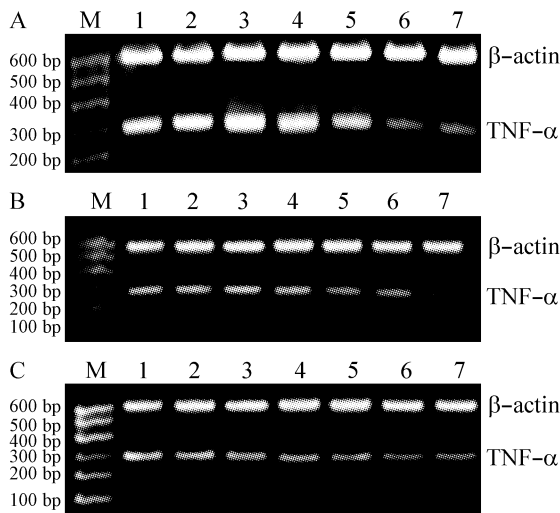


Fig 1 The expressions of rat PBMCs TNF-α mRNA in each group. A: hypoxia group; B: chelerythrine + hypoxia group; C: forskolin + hypoxia group. M: marker; Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: hypoxia 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 h group.

图 1 各组大鼠 PBMCs TNF-α mRNA 表达变化

2 大鼠 PBMCs 培养液上清中 TNF-α 浓度的变化

单纯低氧 1-24 h, 细胞培养液 TNF-α 浓度先升后降,其峰值见于低氧后 6 h。此后, TNF-α 浓度逐渐下降,至低氧 24 h 其浓度与低氧处理前无显著差异。经 chelerythrine 或 forskolin 处理后,上述低氧所诱导的 TNF-α 浓度升高受到明显抑制,低氧处理 1-24 h, TNF-α 浓度不但未升高,而且于低氧处理 12-24 h 还显著低于低氧处理前。另外,低氧 1-24 h, chelerythrine + 低氧组和 forskolin + 低氧组细胞培养液 TNF-α 浓度显著低于单纯低氧组($P < 0.01$, $P < 0.05$),见表 2。

3 大鼠 PBMCs PKC 活性变化

单纯低氧处理 1-24 h, PKC 活性也呈现先升后降特点,其峰值见于低氧处理后 6 h,此后 PKC 活性逐渐下降,于低氧处理后 24 h 显著低于低氧处理前($P < 0.01$)。经 chelerythrine 处理后,上述低氧激活 PKC 的效应受到明显抑制,低氧 1-9 h PKC 活性不但未升高,而且于低氧处理 12-24 h 还显著低于低

表 2 大鼠 PBMCs TNF-α 浓度变化

Tab 2 The changes of rat PBMCs TNF-α concentration in each group (ng/L. $\bar{x} \pm s. n = 7$)

Group	PBMCs TNF-α						
	0 h	1 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
Hypoxia	88.73 ± 7.32	104.28 ± 9.66**	138.01 ± 9.46**	150.43 ± 8.05**	133.02 ± 4.40**	100.57 ± 9.99*	90.80 ± 7.05
Chelerythrine + hypoxia	83.01 ± 9.13	89.50 ± 9.24#	81.35 ± 7.99##	80.50 ± 8.16###	74.33 ± 9.97###	70.20 ± 8.70***	72.36 ± 9.88***
Forskolin + hypoxia	85.93 ± 7.10	93.38 ± 7.83#	85.73 ± 8.43##	82.44 ± 9.50###	78.46 ± 8.19###	67.87 ± 5.14***	70.16 ± 8.29***

*P < 0.05, **P < 0.01 vs hypoxia 0 h group; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs hypoxia group.

氧处理前。而 forskolin 对低氧激活 PKC 的效应无明显抑制作用。低氧 1-9 h, chelerythrine + 低氧组 PKC 活性显著低于单纯低氧组和 forskolin + 低氧组 (P < 0.01), 见表 3、图 2。

表 3 大鼠 PBMCs PKC 活性变化

Tab 3 The changes of rat PBMCs PKC activity in each group (U. $\bar{x} \pm s. n = 7$)

Group	PBMCs PKC activity						
	0 h	1 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
Hypoxia	1.29 ± 0.23	3.78 ± 0.38**	3.37 ± 0.38**	2.61 ± 0.40**	1.88 ± 0.21**	1.06 ± 0.08	0.79 ± 0.06**
Chelerythrine + hypoxia	1.27 ± 0.20	1.33 ± 0.12##	1.23 ± 0.16##	1.46 ± 0.37###	1.17 ± 0.16###	1.03 ± 0.14*	0.81 ± 0.13**
Forskolin + hypoxia	1.22 ± 0.25	3.31 ± 0.25**	3.12 ± 0.21**	2.99 ± 0.18**	2.10 ± 0.21**	0.97 ± 0.15*	0.84 ± 0.09**

*P < 0.05, **P < 0.01 vs hypoxia 0 h group; ##P < 0.01 vs hypoxia group and forskolin + hypoxia group.

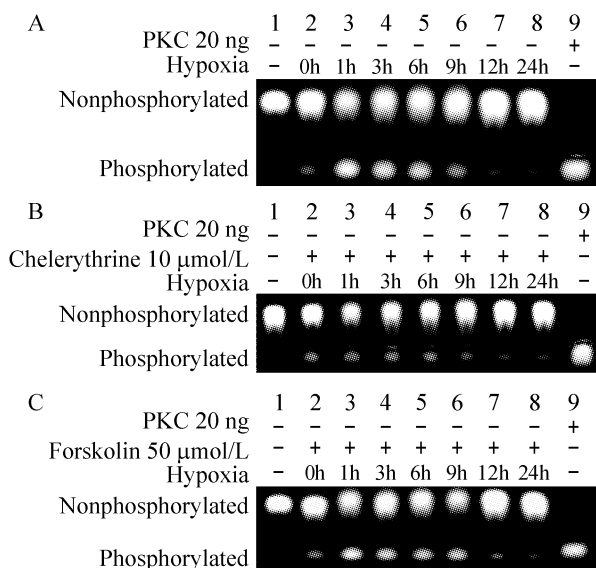


Fig 2 The Changes of rat PBMCs PKC activity in each group. A: hypoxia group; B: chelerythrine + hypoxia group; C: forskolin + hypoxia group. Lane 1: PKC positive control group; Lane 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8: hypoxia 1, 3, 6, 9, 12, 24 h group; Lane 9: PKC negative control group.

图 2 各组大鼠 PBMCs PKC 活性变化

4 大鼠 PBMCs Raf-1 活性变化

单纯低氧处理 1-24 h, Raf-1 活性也呈现先升后降特点, 其峰值见于低氧处理后 6 h, 此后 Raf-1 活性逐渐下降, 于低氧处理后 12-24 h 显著低于低氧处理前 (P < 0.01)。经 chelerythrine 或 forskolin 处理后, 上述低氧激活 Raf-1 的效应受到明显抑制, Raf-1 活性不但未升高, 而且于低氧处理 3-24 h 还显著低于低氧处理前。低氧处理 0-24 h, chelerythrine + 低氧组和 forskolin + 低氧组 Raf-1 活性显著低于单纯低氧组 (P < 0.01), 见表 4。

5 大鼠 PBMCs NF-κB 活性变化

单纯低氧处理 1-24 h, NF-κB 结合活性也呈现先升后降特点, 其峰值见于低氧处理后 6 h, 此后, NF-κB 结合活性逐渐下降, 于低氧处理后 24 h 显著低于低氧处理前 (P < 0.01)。经 chelerythrine 或 forskolin 处理后, 上述低氧增强 NF-κB 结合活性的效应受到明显抑制, 低氧 1-3 h NF-κB 结合活性不但未升高, 而且于低氧处理 6-24 h 还显著低于低氧处理前。低氧 1-24 h, chelerythrine + 低氧组和 forskolin + 低氧组 NF-κB 活性显著低于单纯低氧

表 4 各组大鼠 PBMCs Raf-1 活性变化

Tab 4 The changes of rat PBMCs Raf-1 activity in each group (counts · min⁻¹. $\bar{x} \pm s. n = 7$)

Group	PBMCs Raf-1 activity						
	0 h	1 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
Hypoxia	53 983.17 ± 1 732.61	265 341.10 ± 10 134.10**	210 366.61 ± 13 083.13**	181 584.49 ± 11 294.59**	169 235.55 ± 8 026.31**	44 169.07 ± 649.68*	22 103.04 ± 2 155.51**
Chelerythrine + hypoxia	37 344.63 ± 2 967.85###	40 152.26 ± 1 690.96##	31 384.37 ± 2 663.84***	23 471.03 ± 1 857.84***	23 825.55 ± 5 049.16***	18 776.05 ± 836.13***	8 790.94 ± 2 044.50***
Forskolin + hypoxia	35 782.20 ± 2 795.56###	37 922.81 ± 3 020.28##	30 084.25 ± 2 399.66***	19 094.90 ± 3 331.39***	17 625.65 ± 3 465.71***	14 833.52 ± 2 972.01***	7 755.57 ± 1 441.59***

*P < 0.05, **P < 0.01 vs hypoxia 0 h group; ##P < 0.01 vs hypoxia group.

组($P < 0.01$),见表5、图3。

表5 各组大鼠 PBMCs NF-κB 活性变化

Tab 5 The changes of rat PBMCs NF-κB binding activity in each group (IDV. $\bar{x} \pm s$. $n = 7$)

Group	PBMCs NF-κB						
	0 h	1 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
Hypoxia	4 040.14 ± 223.36	5 148.43 ± 237.57**	5 971.71 ± 179.51**	8 107.57 ± 279.22**	6 466.71 ± 242.23**	4 005.29 ± 309.67	3 941.57 ± 404.30
Chelerythrine + hypoxia	4 327.29 ± 355.48	4 263.43 ± 271.05#	3 963.57 ± 200.86*##	3 842.57 ± 240.10***##	3 697.29 ± 184.31***##	3 367.43 ± 185.91***##	3 172.86 ± 297.50***##
Forskolin + hypoxia	4 121.57 ± 313.17	4 079.29 ± 290.66##	4 064.43 ± 229.13*##	3 652.57 ± 171.37***##	3 455.14 ± 160.16***##	3 092.86 ± 269.18***##	3 036.29 ± 363.35***##

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs hypoxia 0 h group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs hypoxia group.

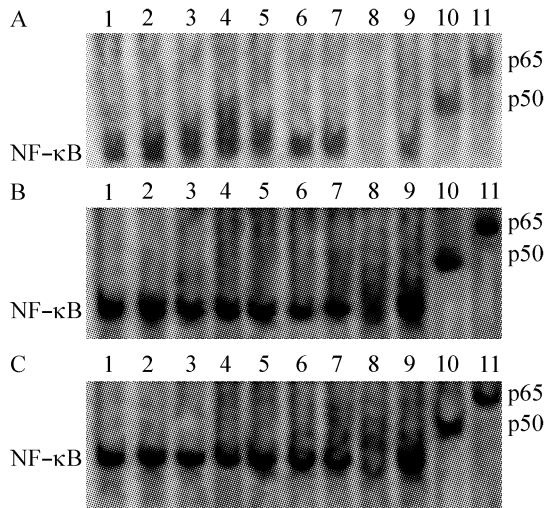


Fig 3 The changes of rat PBMCs NF-κB binding activity in each group. A: hypoxia group; B: chelerythrine + hypoxia group; C: forskolin + hypoxia group; Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: hypoxia 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 h group; Lane 8: add in unlabelled special probe; Lane 9: add in labeled unspecial probe; Lane 10, 11: add in anti-p50 and anti-p65 antibody.

图3 各组大鼠 PBMCs NF-κB 结合活性

6 相关性分析

相关性分析显示,单纯低氧组 PKC、Raf-1、NF-κB 活性变化与 TNF-α mRNA 及蛋白表达量呈显著正相关(r 值分别为:0.822、0.646、0.875、0.754、0.596、0.452, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。

讨 论

研究表明,低氧可直接诱导炎症细胞产生促炎症因子,但其机制尚未完全阐明^[7]。目前关于低氧诱导炎症因子产生的机制存在各种假说,涉及活性氧的产生、前列腺素 H 合成酶 2 生成过多等,但少有研究提及 NF-κB 的作用。最近,Jeong 等^[8]研究发现,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、低氧诱导因子-1(HIF-1)和 NF-κB 可能参与低氧诱导 IL-6 表达的信号转导。NF-κB 作为细胞中一个重要的转录因子,参与调节多数炎症因子的转录和表达,如

TNF-α、白细胞介素(IL-1、2、6、8、12)、集落刺激因子、干扰素等^[9]。

我们的前期工作表明,低氧可通过激活单核细胞 NF-κB,从而启动 TNF-α 的基因转录和表达。但低氧激活 NF-κB 信号通路尚不明确。因此,对低氧激活单核细胞 NF-κB 并诱导 TNF-α 表达信号通路有待深入研究。

NF-κB 是一组真核细胞转录因子,静息状态下,NF-κB 与其抑制蛋白 IκB 以非活性的形式存在于胞浆中。当细胞因子、LPS 等刺激时,IκB 激酶复合物 IKKs(IκB kinases)被激活,使 IκB 经快速磷酸化、泛素化后降解,暴露出 NF-κB 的 DNA 结合域,NF-κB 发生核移位并与相应靶基因上特定的 κB 序列结合,启动靶基因的转录^[10]。IKK 由 IKKα、IKKβ、IKKγ 3 个亚单位组成,IKKα 和 IKKβ 含有 MAPK 所特有的激活位点,Raf-1/MEK/MAPK 是激活 IKK 的主要信号通路^[11]。传统观点认为,Raf-1 是由其上游激酶 Ras 所激活。但实验证明,Ras 仅具有使 Raf-1 由胞浆向胞膜易位的作用,Raf-1 的激活需要依赖其它酪氨酸激酶的参与^[12]。Raf-1 具有多个丝氨酸磷酸化位点和酪氨酸磷酸化位点,其中包括 PKC 的磷酸化位点^[13]。进一步的研究表明,低氧可诱导胞浆中 PKC 向胞膜易位并被活化^[14]。因此我们推测低氧可能通过 PKC/Raf-1/NF-κB 启动 TNF-α 的基因转录和表达。

我们的实验结果表明,低氧 1 h, PBMCs TNF-α mRNA 和蛋白表达量即显著高于低氧 0 h 组($P < 0.01$, $P < 0.05$),至低氧后 6 h 达峰值。检测低氧 1-24 h PBMCs PKC、Raf-1、NF-κB 活性结果表明,低氧 1-9 h, PKC、Raf-1、NF-κB 活性均显著高于低氧 0 h 组($P < 0.01$, $P < 0.05$),而低氧 12-24 h, PKC、Raf-1、NF-κB 活性与低氧 0 h 组无显著差异($P > 0.05$)。相关性分析显示,低氧后 PKC、Raf-1、NF-κB 活性变化与 TNF-α mRNA 和蛋白表达量呈显著正相关($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

为进一步验证该信号通路,我们分别采用 PKC

抑制剂(chelerythrine)和Raf抑制剂(forskolin)干预低氧培养的PBMCs,观测其对上述信号通路的阻断作用和对TNF- α 表达量的影响。结果表明,chelerythrine可阻断PKC/Raf-1/NF- κ B信号通路,而forskolin也可阻断自Raf-1到NF- κ B的信号转导。Chelerythrine和forskolin均能显著抑制低氧诱导的TNF- α mRNA及蛋白表达。

以上实验结果表明,低氧可快速激活PKC、Raf-1和NF- κ B,并诱导大鼠PBMCs高表达TNF- α 。在低氧9 h内Raf-1、NF- κ B活性和TNF- α 表达增强呈时间依赖性。低氧1-24 h,Raf-1、NF- κ B活性与TNF- α mRNA及蛋白表达水平之间呈显著正相关。阻断该信号通路上关键酶的活性可显著抑制低氧诱导的TNF- α mRNA及蛋白表达。因此我们有理由认为,PKC/Raf-1/NF- κ B是低氧诱导单核细胞产生TNF- α 的重要信号通路。

ALI/ARDS是以顽固性低氧血症和全身炎症反应综合征为特征的临床危重症。持续严重的低氧是ALI/ARDS患者发展为多器官功能障碍和死亡的重要因素。我们的实验结果提示,持续低氧可激活单核细胞的PKC、Raf-1、NF- κ B,并诱导TNF- α 大量产生。因此,我们不难理解ALI/ARDS时全身炎症反应综合征持续存在的机制。同时,我们推测尽快纠正低氧,阻断低氧对NF- κ B的激活,可能为ALI/ARDS的防治提供一条新的策略。

但到目前为止,PKC中的哪些同功酶参与了低氧激活PKC/Raf-1/NF- κ B的过程,以及我们实验中发现NF- κ B的活性峰值出现时间较PKC和Raf-1活性峰值延后约5 h,这些疑问尚不得而知。因此,有必要进行更为深入的研究,以期防治ALI/ARDS提供切实可行的方法。

[参 考 文 献]

- [1] 王士雯. 老年多器官功能不全肺启动机制若干问题初探[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2000, 2(3): 149-151.
- [2] Khadaroo RG, Marshall JC. ARDS and the multiple organ dysfunction syndrome. Common mechanisms of a common systemic process[J]. Crit Care Clin, 2002, 18(1): 127-141.
- [3] Heerlein K, Schulze A, Hotz L, et al. Hypoxia decreases cellular ATP demand and inhibits mitochondrial respiration of A549 cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 32(1): 44-51.
- [4] Sandra KLW, Kristina D. Acute hypoxia increases alveolar macrophage tumor necrosis factor activity and alters NF- κ B expression[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 1999, 276(): L909-L916.
- [5] 雷着斌,秦永文,沉茜. 明胶法分离外周血单核细胞[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(12): 1039-1041.
- [6] Li C, Ha T, Liu L, et al. Adenosine prevents activation of transcription factor NF- κ B and enhances activator protein-1 binding activity in ischemic rat heart[J]. Surgery, 2000, 127(2): 162-169.
- [7] Minoguchi K, Tazaki T, Yokoe T, et al. Elevated production of tumor necrosis factor- α by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome[J]. Chest, 2004, 126(5): 1473-1479.
- [8] Jeong HJ, Hong SH, Park RK, et al. Hypoxia-induced IL-6 production is associated with activation of MAP kinase, HIF-1, and NF- κ B on HEI-OC1 cells[J]. Hear Res, 2005, 207(1-2): 59-67.
- [9] 沈凌鸿,陈向东,玷海,等. 原花青素对大鼠急性坏死性胰腺炎肺操作的治疗作用[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(3): 609-611.
- [10] Place RF, Noonan EJ, Giardina C, et al. HDAC inhibition prevents NF- κ B activation by suppressing proteasome activity: down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I κ B α [J]. Biochem Pharmacol, 2005, 70(3): 394-406.
- [11] Bancroft CC, Chen Z, Dong G, et al. Coexpression of proangiogenic factors IL-8 and VEGF by human head and neck squamous cell carcinoma involves coactivation by MEK-MAPK and IKK-NF- κ B signal pathways[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(2): 435-442.
- [12] Rizzo MA, Shome K, Watkins SC, et al. The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras[J]. J Biol Chem, 2000, 275(31): 23911-23918.
- [13] Lee M, Kim JY, Anderson WB, et al. Src tyrosine kinase inhibitor PP2 markedly enhances Ras-independent activation of Raf-1 protein kinase by phorbol myristate acetate and H₂O₂[J]. J Biol Chem, 2004, 279(47): 48692-48701.
- [14] Goldberg M, Zhang HL, Steinberg SF. Hypoxia alters the subcellular distribution of protein kinase C isoforms in neonatal rat ventricular myocytes[J]. J Clin Invest, 1997, 99(1): 55-61.