

炎性刺激剂对小鼠腹腔巨噬细胞 NF- κ B 的诱导

郭颖, 胡玉芳, 程桂芳*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 目的: 建立炎性刺激剂诱导细胞核因子 κ B (Nuclear factor κ B, NF- κ B) 的模型, 研究传统非甾体抗炎药阿司匹林 (aspirin) 作用机理。方法: 用脂多糖 (LPS) 和佛波酯 (PMA) 刺激小鼠腹腔巨噬细胞, 用电泳迁移率改变检测法 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 检测。结果: LPS $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及 $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, PMA $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 均能诱导细胞核内 NF- κ B 的含量。阿司匹林 $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可以显著抑制 LPS ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 PMA ($2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对细胞核内 NF- κ B 的活化。结论: 所建立的以 LPS 和 PMA 为刺激剂, 诱导细胞核内 NF- κ B 的模型, 可用于非甾体抗炎药的抗炎机理的研究。

关键词 细胞核因子 κ B; 电泳迁移率改变检测法; 脂多糖; 佛波酯

NF- κ B 作为小鼠 B 淋巴细胞 κ 轻链基因表达的一种调节因子始被确认, 而在多种不同的细胞中也均观察到其活性。在未被激活的细胞中, NF- κ B 存在于胞浆中, 并且与抑制性 κ B α (I κ B α) 和抑制性 κ B β (I κ B β) 结合, 这种结合可阻止 NF- κ B 进入核内。当细胞被激活时, 特异性的激酶将 I κ B 磷酸化, 使其快速被蛋白小体降解, 从 I κ B 释放下来的 NF- κ B 可进入细胞核, 然后激活在靶基因启动子区域的特殊序列上^[1]。NF- κ B 不仅参与调节免疫和炎症反应过程中多种基因的表达, 而且还经常与其它转录因子共同作用。很多刺激剂 (包括细胞因子、蛋白激酶 C 激活剂、病毒和氧化剂等) 均可以激活 NF- κ B。本文基于此论点, 建立脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和佛波酯 (phorbol 12-myristate, 13-acetate, PMA) 诱导小鼠腹腔巨噬细胞 NF- κ B 的模型, 为寻找抗炎免疫药物提供新靶点。

材 料 和 方 法

动物 雄性体重 16~20 g C₅₇BL/6 小鼠, 由中国医学科学院实验动物中心提供。

药品及仪器 脂多糖 (E coli Serotype 055: B5)、佛波酯、亚精胺 (spermidine) 和苯甲基磺酰氟 (phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF) 均为 Sigma

产品; 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 为 Fisher Biotech 公司产品; Poly(dI-dC)-Poly(dI-dC) 和 T₄ 激酶 (T₄ polynucleotide kinase) 为 Pharmacia 公司产品; [γ -³²P] ATP 为北京亚辉公司产品; 巯基乙醇酸钠 (brewer thioglycollate medium) 为 Difco 公司产品; RPMI-1640 及新生牛血清为 Gibco 产品; NF- κ B 探针 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3', 3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCCG-5' 购于 Promega 公司。突变序列 5'-AGTTGAGGCGACTTTCCCAGGC-3', 3'-TCAACTCCGCTGAAAGGGTCCCG-5' 及 Pestle B 为美国宋新生教授惠赠。

小鼠腹腔巨噬细胞的制备及培养 按文献^[2]方法, 小鼠 ip 4% 巯基乙醇酸钠, 每只 1 mL, 3~4 d 后断头处死, 在无菌条件下用磷酸缓冲液 (PBS) ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$: NaCl 137.0; KCl 2.7; Na₂HPO₄·H₂O 9.8; KH₂PO₄ 1.5, pH 7.3) 洗出腹腔巨噬细胞, 再以 PBS 洗涤细胞两次, 细胞计数, 用 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度为 5×10^6 细胞·mL⁻¹, 每只 60 mm 的培养皿中加入 3 mL, 在 CO₂ 培养箱内培养 2 h 后, 弃去上清液, 加入含 10% 新生牛血清 (NBS) 及各种刺激剂的 RPMI-1640 3 mL 培养 1 h。

细胞核蛋白的提取^[3] 将培养皿上的细胞刮下, $300 \times g$ 离心 5 min, 用 PBS 洗两次, 加入缓冲液 A ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$: HEPES 10.0; MgCl₂ 1.5; KCl 10.0; DTT 0.05) 7 mL, 用 Pestle B 匀浆 15 次, $800 \times g$ 离心 5 min, 弃去上清液。加入缓冲液 C ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$: HEPES 20.0; 甘油 25% (v/v); NaCl 420.0;

收稿日期: 1998-11-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (3980907)

* 联系人 Tel: (010) 63165192, Fax: (010) 63017757

郭颖 女, 26 岁, 博士研究生

程桂芳 女, 60 岁, 研究员, 博士生导师

MgCl₂ 1.5; EDTA 0.2; PMSF 0.5; DTT 0.5) 0.5 mL, 冰浴中振摇 30 min, 4℃ 12 000 × g 离心 30 min, 吸取上清液。向上清液中加入 1/2 体积的饱和硫酸铵溶液, 4℃ 放置 30 min, 4℃ 12 000 × g 离心 15 min。弃去上清液, 加入缓冲液 W (mmol·L⁻¹: HEPES 20.0; KCl 20.0; MgCl₂ 1.0; DTT 2.0; PMSF 1.0; 甘油 17% (v/v)) 100 μL, 上 Sephadex G-25 柱 (6 cm × 6 mm), 得到核提取物。Lowry 法测定蛋白浓度。

寡核苷酸链的标记^[4] 向小管中加入 NF-κB 探针 (1.75 pmol·μL⁻¹) 2.0 μL, 10 × kinase buffer (mmol·L⁻¹: Tris 500; MgCl₂ 100; DTT 50; 亚精胺 1.0; EDTA 1.0) 1.0 μL, H₂O 4.0 μL, [³²P] ATP 2.0 μL, T₄ 激酶 (5~ 10 u·μL⁻¹) 1.0 μL, 37℃ 温育 10 min, 加入 0.5 mol·L⁻¹ EDTA 1.0 μL, 加水 89 μL, 上 Sephadex G-25 柱, 收集水溶液, -20℃ 保存。

核蛋白与 DNA 探针的结合及电泳^[5] 向小管

中加入 2 × buffer (mmol·L⁻¹: Tris 40.0; MgCl₂ 10.0; KCl 200.0; EDTA 2.0; DTT 2.0; BSA 2 mg·mL⁻¹; 甘油 14% (v/v)) 10 μL, Poly (dI-dC)-Poly (dI-dC) 1.0 μg, 加水至 18 μL, 加入核提取物 1~ 5 μL, 混匀, 室温放置 10 min。向每份样品中加入 ³²P-DNA 探针 2 μL, 混匀, 电泳 (8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳)。干胶后进行放射自显影。

结 果

1 不同浓度 LPS 对小鼠腹腔巨噬细胞 NF-κB 的影响

结果如图 1 所示, 条带 3 及条带 4 为 NF-κB 与寡核苷酸链结合条带, 提示本方法是特异的。实验结果表明 LPS (1 μg·mL⁻¹, 3 μg·mL⁻¹) 均可激活细胞核内 NF-κB, 且 3 μg·mL⁻¹ 的活化程度比 1 μg·mL⁻¹ 强。

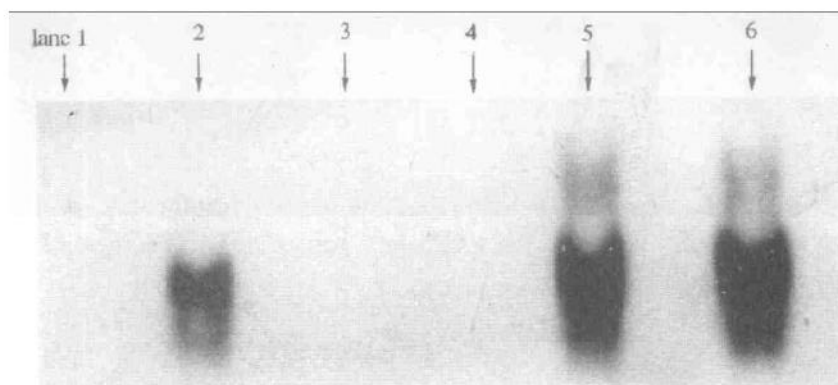


Fig 1 Effects of lipopolysaccharide(LPS) on the activities of NF-κB in inducible peritoneal macrophages from the mouse. 1. Probe alone; 2. Control; 3. κB+ comp^{*}; 4. Mut^{**} + comp; 5. LPS 1 μg·mL⁻¹; 6. LPS 3 μg·mL⁻¹. Nuclear extracts were prepared from inducible peritoneal macrophages from the mouse treated for 60 min with indicated amount of LPS and incubated with ³²P-labeled oligonucleotides encompassing NF-κB or mutational(mut) consensus motifs followed by analysis with EMSA. In lanes 3 and 4, a 100-fold molar excess of unlabeled specific oligonucleotide was added to the binding reactions. * Comp= competitive consensus; ** Mut = mutational consensus.

2 不同浓度 PMA 对小鼠腹腔巨噬细胞 NF-κB 的影响

实验结果表明 PMA 1 ng·mL⁻¹ 不能显著激活细胞核内 NF-κB, 而 2 ng·mL⁻¹ 可显著活化 NF-κB (图 2)。

3 阿斯匹林对 LPS 激活的小鼠腹腔巨噬细胞中 NF-κB 的影响

阿斯匹林与细胞温育 15 min 后, 再用 LPS 刺激

1 h。

实验结果表明阿斯匹林 (10⁻⁷ mol·L⁻¹, 10⁻⁶ mol·L⁻¹, 10⁻⁵ mol·L⁻¹) 均可以显著地抑制 LPS 活化的 NF-κB 的含量, 并且有一定的量效关系 (图 3)。

4 阿斯匹林对 PMA 激活的小鼠腹腔巨噬细胞中 NF-κB 的影响

实验结果表明阿斯匹林 (10⁻⁵ mol·L⁻¹) 可以显著地抑制 PMA 活化的 NF-κB 的含量 (图 4)。

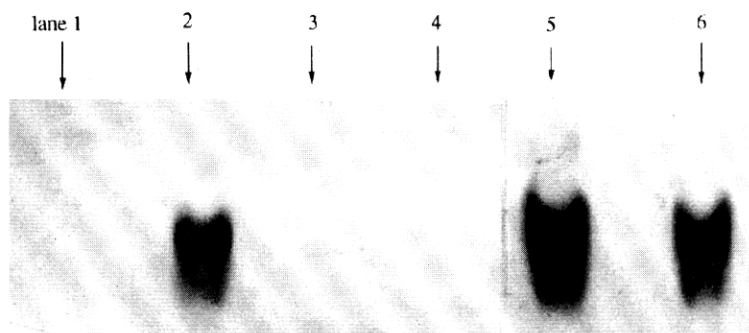


Fig 2 Effects of PMA (phorbol 12-myristate, 13-acetate) on the activities of NF- κ B in inducible peritoneal macrophages from the mouse. 1. Probe alone; 2. Control; 3. κ B + comp; 4. Mut + comp; 5. PMA 2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 6. PMA 1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Nuclear extracts were prepared from inducible peritoneal macrophages from the mouse treated for 60 min with indicated amount of PMA and incubated with ^{32}P -labeled oligonucleotides encompassing NF- κ B or mutational consensus motifs followed by analysis with EMSA. In lanes 3 and 4, a 100-fold molar excess of unlabeled specific oligonucleotide was added to the binding reactions.

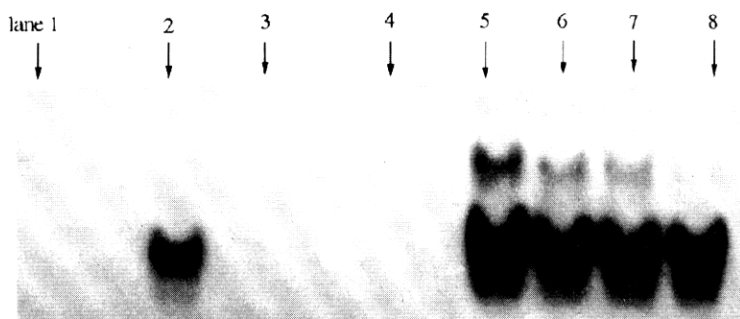


Fig 3 Effects of aspirin on LPS ($1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)-induced NF- κ B activation in inducible peritoneal macrophages from mouse. 1. Probe alone; 2. Control; 3. κ B + comp; 4. Mut + comp; 5. LPS $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 6. Aspirin $10^{-7}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + LPS $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 7. Aspirin $10^{-6}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + LPS $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 8. Aspirin $10^{-5}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + LPS $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

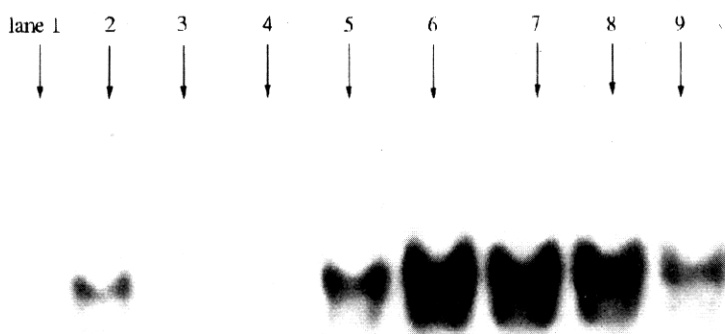


Fig 4 Effects of aspirin on PMA ($2\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)-induced NF- κ B activation in inducible peritoneal macrophages from mouse. 1. Probe alone; 2. Control; 3. κ B + comp; 4. Mut + comp; 5. Control; 6. PMA $2\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 7. Aspirin $10^{-7}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + PMA $2\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 8. Aspirin $10^{-6}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + PMA $2\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 9. Aspirin $10^{-5}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + PMA $2\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

讨 论

用电泳迁移率改变法检测细胞核内 NF- κ B 含

量灵敏度高, 特异性强。本实验选择了两种刺激剂: LPS 和 PMA, 它们分别具有 B 细胞激活剂和蛋白激酶 C 的活化作用, 用这两种刺激剂可以研究在两种

不同途径下对 NF- κ B 的激活作用。本实验观察到: LPS 在 $1\sim 3\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度下可诱导小鼠腹腔巨噬细胞中 NF- κ B 的含量; 而 PMA 在 $2\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度下使 NF- κ B 的含量显著升高。若 LPS 和 PMA 有效活化强度以克分子比较, 则分别为 $1.6\times 10^{-8}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3\times 10^{-9}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (两者 Mr 分别为 617 和 130 000)。

阿斯匹林作为传统的抗炎药物, 其机理备受关注。本文发现阿斯匹林可从不同途径抑制激活的 NF- κ B, 为进一步阐明阿斯匹林的抗炎作用的分子机理提供了实验依据。

致谢 本方法的建立得到宋新生教授 (Department of Internal Medicine, University of Virginia, USA) 的指导和帮助。

References

- 1 Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: ten years after. *Cell*, 1996, **87**: 13
- 2 Xu SY (徐叔云), Bian RL (卞如濂), Chen X (陈修), eds. *Experimental Methods in Pharmacology* (药理实验方法学). 2nd. Edition. Beijing: People's Health Publishing House, 1991. 1235
- 3 Digman JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 1983, **11**: 1475
- 4 Lu SD (卢圣栋), ed. *Modern Molecular Biology* (现代分子生物学). Beijing: Higher Educational Publishing House, 1993. 355
- 5 Wang P, Wumarvin P, Siegel I, et al. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor κ B (NF- κ B) activation in human monocytes. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 9558

INDUCTION OF NF- κ B IN MOUSE PERITONEAL MACROPHAGES BY INFLAMMATORY IRRITANTS

Guo Ying(Guo Y), Hu Yufang(Hu YF) and Cheng Guifang(Cheng GF)

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

ABSTRACT AIM: To establish the model of determining nuclear factor κ B (NF- κ B) which is stimulated by different inflammatory irritants in inducible peritoneal macrophages from mouse and investigate the inhibitory effect of aspirin on NF- κ B activation using this model. **METHODS:** Lipopolysaccharide (LPS) and phorbol 12-myristate, 13-acetate (PMA) were used as irritants. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was used as the determination method. **RESULTS:** LPS ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $3\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and PMA ($1\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) was shown to increase the content of NF- κ B in inducible peritoneal macrophages from the mouse. After the macrophages were treated with aspirin ($10^{-7}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $10^{-6}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $10^{-5}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), the increase was inhibited. **CONCLUSION:** The model of determining NF- κ B stimulated by LPS and PMA can be used in researching mechanism of non-steroidal anti-inflammatory drugs.

KEY WORDS nuclear factor- κ B; electrophoretic mobility shift assay; lipopolysaccharide; phorbol 12-myristate, 13-acetate