

[文章编号] 1000-4718(2007)07-1412-03

# LPS 致大鼠肺泡巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 促进 TNF- $\alpha$ 分泌

张方<sup>1</sup>, 李子玲<sup>1</sup>, 施毅<sup>1,Δ</sup>, 赵明<sup>1</sup>, 辛晓峰<sup>1</sup>, 钱桂生<sup>2</sup>( <sup>1</sup>南京军区南京总医院呼吸内科, 江苏 南京 210002; <sup>2</sup>第三军医大学新桥医院呼吸研究所, 重庆 400037)

**[摘要]** 目的: 观察脂多糖(LPS)致大鼠肺泡巨噬细胞(AMs)中核因子NF- $\kappa$ B活性及其调控肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )分泌的作用。方法: LPS作用大鼠AMs后,用电泳迁移率改变分析法(EMSA)测NF- $\kappa$ B活性;用特异的反义寡核苷酸阻断NF- $\kappa$ B亚基(p65)后,Western blotting检测p65表达变化;ELISA法检测细胞上清中TNF- $\alpha$ 的含量。结果: 于LPS作用AMs后4h,NF- $\kappa$ B活性达到峰值,24h仍维持在高水平;作用后4h上清中TNF- $\alpha$ 的含量达到峰值。反义寡核苷酸阻断NF- $\kappa$ B亚基(p65)表达后,LPS致AMs上清中TNF- $\alpha$ 的含量显著低于未阻断组( $P < 0.01$ )。结论: LPS致大鼠AMs中NF- $\kappa$ B正向调控TNF- $\alpha$ 分泌。

[关键词] 巨噬细胞,肺泡;NF- $\kappa$ B;脂多糖类;肿瘤坏死因子

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

## Nuclear factor $\kappa$ B in LPS stimulated rat alveolar macrophages promotes TNF- $\alpha$ secretion

ZHANG Fang<sup>1</sup>, LI Zi-ling<sup>1</sup>, SHI Yi<sup>1</sup>, ZHAO Ming<sup>1</sup>, XIN Xiao-feng<sup>1</sup>, QIAN Gui-sheng<sup>2</sup>( <sup>1</sup>Department of Respiration Diseases, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, China; <sup>2</sup>Institute of Respiration Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China. E-mail: zhangfanglab@yahoo.com.cn)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the activation of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) induced by lipopolysaccharides (LPS) in rat alveolar macrophages (AMs) and its regulatory role in tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) secretion. **METHODS:** The dynamic activity changes of NF- $\kappa$ B induced by LPS were determined with electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Antisense oligonucleotides of NF- $\kappa$ B subunit (p65) were transfected into AMs prior to LPS stimulation. The effect of antisense oligonucleotide transfection on expressions of p65 and TNF- $\alpha$  in supernatant were measured with Western blotting and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. **RESULTS:** NF- $\kappa$ B activity increased markedly and reached its peak level at 4 h after LPS stimulation. After transfected with antisense oligonucleotides of NF- $\kappa$ B subunit (p65), expression of p65 and TNF- $\alpha$  in supernatant decreased markedly. **CONCLUSION:** NF- $\kappa$ B activity has a positive effect on regulating secretion of TNF- $\alpha$  in AMs induced by LPS.

[KEY WORDS] Macrophages, alveolar; NF- $\kappa$ B; Lipopolysaccharides; Tumor necrosis factor

肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages, AMs)是肺部防御病原微生物和肺损伤的第一道防线,是肺部的主要炎症细胞,在脓毒症的发病过程中扮演了非常关键的角色。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可诱导AMs产生多种细胞因子,如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1(IL-1)、IL-6、IL-8等<sup>[1,2]</sup>。研究发现,TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6等多种炎症介质的基因调控区均具有核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的结合位点,NF- $\kappa$ B在多种炎症介质的表达调控中均具有重要作用,因而备受关注<sup>[3]</sup>。NF- $\kappa$ B的适度活化对于机体抵御病原微生物的危害具有重要意义,但NF- $\kappa$ B过度活化并导致多种炎症介质的过

量表达释放则是引起脓毒症、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)以及多器官功能障碍综合征(MODS)发生的重要机制<sup>[4]</sup>。由LPS引起的脓毒症发生时,肺脏是最早受攻击的器官,因此,从核转录因子水平搞清LPS诱导AMs活化的信号转导机制,对于研究和治疗脓毒症具有非常重要的意义。

NF- $\kappa$ B有p50/p65异源二聚体和p50/p50同源二聚体两种构成方式,其中p65亚基在蛋白的C-末端含有转录激活区域,能直接作用于顺式元件而激活转录过程;p50亚基在基因表达调控方面几乎没有作用。因此,本研究以大鼠AMs为研究对象,通过反义寡核苷酸技术阻断NF- $\kappa$ B中p65亚基的表达,

[收稿日期] 2005-10-11 [修回日期] 2005-12-23

Δ通讯作者 Tel:025-80863178;E-mail:zhangfanglab@yahoo.com.cn

进而抑制 NF- $\kappa$ B 的活性<sup>[5]</sup>;探讨抑制 NF- $\kappa$ B 活性后,LPS 作用的 AMs 上清中炎症介质 TNF- $\alpha$  含量变化,以期揭示 NF- $\kappa$ B 作为炎症信号的最终汇合点,可参与炎症介质 TNF- $\alpha$  的表达调控,在 LPS 引起的炎症反应中起非常重要的调控作用。

## 材 料 和 方 法

### 1 主要试剂

LPS (Sigma); DMEM 培养基 (Gibco); 胎牛血清 (宝灵曼公司); [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (北京亚辉公司); T4 多聚核苷酸激酶、EMSA 试剂盒 (Promega); 山羊抗人 p65 亚基单克隆 IgG 抗体 (Santa Cruz); 大鼠 TNF- $\alpha$  酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测试剂盒 (Endogen); Oligofectamine<sup>TM</sup> Reagent (Invitrogen)。

### 2 原代 AMs 的分离及培养

健康 Wistar 大鼠, 体重 150-180 g, 雌雄不分, 购自南京军区南京总医院实验动物中心。原代大鼠 AMs 的分离及培养按文献方法进行<sup>[6]</sup>。从每只大鼠分离、培养的 AMs 接种于 6 孔板中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养, 待细胞融合至 70% 后使用。

### 3 细胞分组及处理

将生长良好的 AMs 随机分为: 正常对照组 (加等量生理盐水)、LPS 处理组 (分为 1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 时点), 用含有 LPS 的 DMEM 培养基作用细胞, LPS 浓度为 100  $\mu$ g/L, 于不同时点收集细胞。

### 4 EMSA 检测 NF- $\kappa$ B 活性

NF- $\kappa$ B 探针序列 (P1: 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'; P2: 5'-GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T-3') 由上海生工合成。探针标记和核蛋白的抽提按说明书进行。取 3  $\mu$ g 核蛋白, DNA 结合缓冲液 10  $\mu$ L、标记探针 1  $\mu$ L, 加 H<sub>2</sub>O 至总反应体积 21  $\mu$ L, 置 37 °C 孵育 30 min, 加上样缓冲液 4  $\mu$ L。同时设不加核蛋白的阴性对照组。反应产物经 5% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完毕, 凝胶置 -70 °C 放射自显影。电泳滞后带用凝胶图像分析仪进行密度扫描, 以其灰度值与滞后带面积之积表示 NF- $\kappa$ B 的活性。

### 5 反义寡核苷酸阻断 p65 亚基及阻断效率检测

p65 反义寡核苷酸由上海生工合成, 序列参阅文献<sup>[7]</sup>。p65 反义寡核苷酸序列: 5'-GGG GAA CAG TTC GTC CAT GGC-3'; p65 正义寡核苷酸序列: 5'-GCC ATG GAC GAA-CTG TTC CCC-3'。全部寡核苷酸经全硫代修饰对抗核酸酶的降解。采用阳离子脂质体转染, 转染过程参照该产品说明书。每孔加入含脂质体和寡核苷酸的无血清 DMEM 培养基, 寡核苷酸终浓度为 200 nmol/L, 转染 48 h 后用于检测。另设只加入脂质体处理的细胞作为对照组。用

Western blotting 检测 p65 亚基的阻断效率: 取 20  $\mu$ g 细胞蛋白抽提液, 行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。待电泳完毕后用 Bio-Rad 公司的半干电转移槽转移至硝酸纤维素膜上, 在室温下用封闭缓冲液 (10 g/L 脱脂奶粉, 0.3% Tween-20, PBS) 封闭 3 h。再依次与 p65 I 抗、II 抗 (酶标 HRP 抗体) 反应后, 增强化学发光法显色, X 光底片曝光显影。

### 6 ELISA 法检测上清中 TNF- $\alpha$ 含量

转染 p65 亚基正义、反义寡核苷酸后 48 h, 给予 LPS (100  $\mu$ g/L) 刺激, 观察刺激后 4、8、12 和 24 h 细胞上清中 TNF- $\alpha$  含量变化; 另设未处理组作为对照。

### 7 统计学处理

所有数据资料均取 3 批实验的平均值, 用  $\bar{x} \pm s$  表示, 利用 SPSS 10.0 统计软件行方差分析及均数间的多重比较。

## 结 果

### 1 LPS 上调 AMs NF- $\kappa$ B 活性

对照组 NF- $\kappa$ B 活性呈低水平表达, LPS 刺激后 2 h NF- $\kappa$ B 活性显著升高, 4 h 达到峰值, 随后 8、12 和 24 h 活性有所降低, 但仍维持在较高水平。EMSA 结果见图 1、表 1。

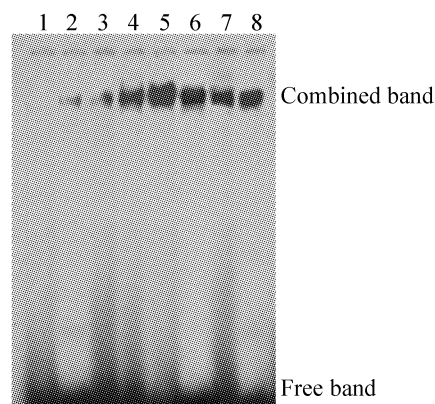


Fig 1 Changes of NF- $\kappa$ B activity after LPS treated AMs. Lane 1: negative control; Lane 2: normal control; Lane 3-8: LPS (100  $\mu$ g/L) 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h NF- $\kappa$ B activity.

图 1 LPS 刺激 AMs 后 NF- $\kappa$ B 的活性变化

### 2 反义寡核苷酸显著阻断 p65 亚基表达

正义寡核苷酸转染组与对照组比较, p65 亚基表达无显著差别, 而反义寡核苷酸转染组 p65 亚基表达则显著下调 ( $P < 0.01$ ), 抑制率达到 78.6%。各组 p50 亚基表达无显著差别, 见图 2。

### 3 阻断 p65 亚基表达后, 上清中 TNF- $\alpha$ 含量显著下调

反义阻断组 (antisense) 各时相点细胞上清中 TNF- $\alpha$  含量明显低于对照组 (normal)、正义阻断组 (sense) ( $P < 0.01$ ), 见表 1。

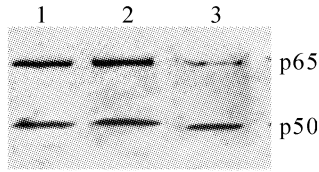


Fig 2 Detection of blocking effect on p65 subunit expression after sense oligonucleotides and antisense oligonucleotides transfection with Western blotting. Lane 1: control; Lane 2: sense oligonucleotides of p65 subunit transfection group; Lane 3: antisense oligonucleotides of p65 subunit transfection group.

图2 Western blotting 检测 p65 亚基反义和正义寡核苷酸转染后阻断效应

表1 LPS 刺激 AMs NF-κB 活性变化及 p65 亚基阻断对上清 TNF-α 含量的影响

Tab 1 Changes of NF-κB activity and effects of blocking p65 subunit expression on TNF-α content in supernatant after LPS treated AMs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Group	NF-κB (INT/mm <sup>2</sup> )	TNF-α (ng/L)		
		Normal	Sense	Antisense
Control	3.14 ± 0.20	0.336 ± 0.063	0.339 ± 0.094	0.334 ± 0.072
1 h	3.68 ± 0.16			
2 h	7.01 ± 0.56*			
4 h	19.16 ± 0.53*	0.967 ± 0.092*	0.916 ± 0.083*	0.718 ± 0.064* <sup>Δ#</sup>
8 h	17.13 ± 0.23*	0.636 ± 0.063*	0.647 ± 0.092*	0.516 ± 0.055* <sup>Δ#</sup>
12 h	15.14 ± 0.65*	0.448 ± 0.087	0.442 ± 0.073	0.365 ± 0.075 <sup>Δ#</sup>
24 h	11.96 ± 0.57*	0.444 ± 0.065	0.443 ± 0.077	0.333 ± 0.084 <sup>Δ#</sup>

\* $P < 0.01$  vs control group; <sup>Δ</sup> $P < 0.01$  vs normal group; <sup>#</sup> $P < 0.01$  vs sense group.

## 讨 论

NF-κB 是体内与炎症相关的及早转录因子, LPS 作用 AMs 后, NF-κB 活性明显上调, 其过度活化与炎症介质的释放密切相关。ARDS 患者 AMs 中 NF-κB 的活性显著高于其它疾病的危重患者<sup>[8]</sup>, 提示 NF-κB 的持续活化进一步引起炎症介质的过度表达和释放, 可能是导致脓毒症、ARDS、过度炎症反应综合征 (SIRS) 等失控性炎症反应发生的关键因素。因此, 通过抑制 NF-κB 表达或者抑制其活性发挥, 有望成为新的抗炎手段或策略。

反义寡核苷酸阻断技术是研究细胞生物学信号转导机制的一项生物高技术, 通过转染特定基因的反义寡核苷酸, 封闭与其特异性互补的 mRNA 的表达, 阻止其翻译成蛋白质, 从而特异性地阻断该基因的表达。一般而言, 阻断效率达到 70% 以上, 即可认为阻断成功, 该技术为研究基因的生物学功能提供有力的技术手段<sup>[9]</sup>。本研究以 NF-κB 的 p65 亚基作为靶点, 运用该技术有效抑制 p65 亚基的表达, 而

对 p50 亚基的表达无明显影响, 表明了反义寡核苷酸阻断技术的高效性和特异性; 进一步的研究结果表明: 阻断 p65 亚基的表达可以有效降低 LPS 致鼠 AMs 上清中 TNF-α 含量, 反证了活化的 NF-κB 正向调控炎症介质 TNF-α 分泌。

目前, 抗炎治疗是脓毒症治疗的基本策略, 糖皮质激素、阿司匹林、水杨酸钠等传统抗炎药能通过多种途径阻断 NF-κB 等核转录因子的活性, 因而可有效降低相关炎症介质的表达释放。而反义寡核苷酸阻断技术与传统抗炎药物相比具有更高的特异性。本研究应用该技术特异性地抑制 p65 亚基表达, 降低炎症介质的释放, 表现出很好的抗炎前景。综上所述, 针对 NF-κB 的反义寡核苷酸阻断技术有望成为研究和治疗炎症反应的重要手段。

## [参 考 文 献]

- [1] Dai H, Guzman J, Chen B, et al. Production of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor-α by alveolar macrophages in sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis[J]. Chest, 2005, 127(1): 251-256.
- [2] D'Angio CT, LoMonaco MB, Johnston, et al. Differential roles for NF-κB in endotoxin and oxygen induction of interleukin-8 in the macrophage[J]. Am J Physiol, 2004, 286(1): L30-L36.
- [3] Ritchie MH, Fillmore RA, Lausch RN, et al. A role for NF-κB binding motifs in the differential induction of chemokine gene expression in human corneal epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(7): 2299-2305.
- [4] Castro P, Legora MA, Cardilo RL, et al. Inhibition of interleukin-1β reduces mouse lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke[J]. Eur J Pharmacol, 2004, 498(1-3): 279-286.
- [5] Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-κB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses[J]. Ann Rev Immunol, 1998, 16(1): 225-260.
- [6] 张德明, 李永旺, 毛宝龄, 等. Toll 样受体 4 与大鼠肺泡巨噬细胞内毒素耐受性的实验研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(7): 411-414.
- [7] Azuma M, Motegi K, Aota K, et al. TGF-β1 inhibits NF-κB activity through induction of IκB-α expression in human salivary gland cells: a possible mechanism of growth suppression by TGF-β1[J]. Exp Cell Res, 1999, 250(1): 213-222.
- [8] Jarrar D, Kuebler JF, Rue LW, et al. Alveolar macrophage activation after trauma-hemorrhage and sepsis is dependent on NF-κB and MAPK/ERK mechanisms[J]. Am J Physiol, 2002, 283(4): L799-L805.
- [9] Nesterova M, Cho-Chung YS. Killing the messenger: antisense DNA and siRNA[J]. Curr Drug Targets, 2004, 5(8): 683-689.