

文章编号:1000-5404(2012)07-0597-05

论著

胆汁酸 G-蛋白偶联受体通过 p38 MAPK 通路诱导巨噬细胞 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的转录

张闻宇^{1,2}, 黄文栋², 娄桂予^{2,3} (450003 郑州, 河南省郑州人民医院内分泌科¹; 91010 杜尔特, 美国 City of Hope 医学中心 Beckman 研究所²; 400038 重庆, 第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室³)

[摘要] 目的 观察胆汁酸 G-蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor for bile acids, TGR5)被齐墩果酸(oleanolic acid, OA)激活后对 RAW264.7 细胞白细胞介素-1(interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)转录的影响及其机制的探讨。**方法** 通过实时荧光定量(Real-time)PCR 法检测 OA 作用不同时间 RAW264.7 细胞和原代枯否细胞 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 mRNA 的表达;并进一步分析在 RAW264.7 细胞中加入 3 种不同信号通路的抑制剂对上述 3 种炎症因子 mRNA 表达的影响。OA 作用 RAW264.7 细胞和原代枯否细胞不同时间后, Western blot 分析 p38 MAPK 的磷酸化水平。**结果** OA 刺激 RAW264.7 细胞 6、12、24 h 后, IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达明显升高。OA 作用于分离的原代枯否细胞 3 h 和 6 h 后, 也可观察到相同的结果。p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 可以明显地抑制 OA 诱导的 RAW264.7 细胞内 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 mRNA 的表达, 但 PKA 和 NF- κ B 的抑制剂无此作用。RAW264.7 细胞和原代枯否细胞经 OA 刺激后, p38 MAPK 磷酸化水平明显增强。**结论** TGR5 可能通过活化 p38 MAPK 磷酸化诱导炎症细胞 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 mRNA 的表达, 提示 TGR5 在无其他刺激因素作用下, 具有诱导炎症因子表达的作用。

[关键词] 胆汁酸 G-蛋白偶联受体; 齐墩果酸; RAW264.7 细胞株; 枯否细胞; 促炎因子

[中图分类号] R392.11; R392.3; R363.21

[文献标志码] A

TGR5 induces IL-1 β , TNF- α and IL-6 mRNA transcription by p38 MAPK pathway in mouse macrophages

Zhang Wenyu^{1,2}, Huang Wendong², Lou Guiyu^{2,3} (¹Department of Endocrinology, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou, Henan Province, 450003, ²Department of Biochemistry Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China; ³Backman Research Institution, City of Hope, Duarte, 91010, USA)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of plasma membrane-bound G protein-coupled receptor for bile acids (TGR5) activation by oleanolic acid (OA) on the expression of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in mouse macrophages. **Methods** Real-time PCR was used to detect the expression of IL-1 β , TNF- α and IL-6 at mRNA level after rat macrophage RAW264.7 cells and Kupffer cells were incubated with OA in different time periods. And the expression of these inflammatory factors were further analyzed by the same method when RAW264.7 cells were stimulated by inhibitors of 3 different signal pathway plus OA. The phosphorylation level of p38 MAPK was measured by Western blotting. **Results** Treatment of RAW264.7 cells with OA resulted in a robust increase in IL-1 β , IL-6 and TNF- α transcripts at 6, 12 and 24 h compared with untreated control cells. Similarly, an up-regulation of IL-1 β , IL-6 and TNF- α expression was also observed in isolated Kupffer cells at 3 and 6 h. Pre-treatment of RAW 264.7 cells with a p38 MAPK inhibitor SB203580 markedly reduced the OA-induced increase of IL-1 β and TNF- α transcription, but not for PKA or NF- κ B inhibitors. p38 phosphorylation was increased by OA treatment in both RAW 264.7 cells and Kupffer cells. **Conclusion** TGR5 activation induces IL-1 β , IL-6 and TNF- α expression through p38 MAPK activation, indicating that TGR5 possesses pro-inflammatory properties when without any other stimulus.

[Key words] TGR5; oleanolic acid; RAW264.7 cells; Kupffer cells; inflammatory factors

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30600299). Corresponding author. Lou Guiyu, Tel: 86-23-68752944, E-mail: louguiyu@hotmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30600299)

[通信作者] 娄桂予, 电话: (023)68752944, E-mail: louguiyu@hotmail.com

胆汁酸 G-蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor for bile acids, TGR5)是胆酸的 G 蛋白偶联膜受体,可差异性表达于各种组织^[1-3]。石胆酸、脱氧胆酸等疏水性胆酸是其天然配体。TGR5 被活化后,主要在糖代谢和能量代谢及维持胆汁酸代谢平衡中发挥重要作用^[4-6]。也有研究发现,TGR5 表达于肝脏的枯否细胞(肝脏中表达致炎因子的主要细胞)等巨噬细胞^[7];而且兔外周血分离的巨噬细胞和外源性表达 TGR5 的单核细胞系 THP-1 能抑制内毒素(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达^[1]。这些研究提示,TGR5 可能在炎症和机体免疫中扮演者重要角色。近期的一项体内研究也表明,TGR5 的活化减轻了由 LPS 诱导的肝脏炎症,进一步证实其在炎症中的作用^[8]。然而,在无任何刺激因素作用下,TGR5 在细胞因子表达中的生理作用仍不清楚。齐墩果酸(oleanolic acid, OA)是已被证实的 TGR5 的活化剂^[1],本研究旨在观察 TGR5 被 OA 活化后,对巨噬细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达的影响,并进一步分析 TGR5 激活后引起炎症因子表达变化的信号传导通路,以明确其在炎症过程中的生理作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

p38 MAPK 抑制剂 SB203580、PKA 抑制剂 H89 和 NF- κ B 抑制剂 BMS-345541 购自 Calbiochem 公司,小鼠单克隆磷酸化 p38 抗体购自 Cell Signalling 公司,Oleanolic acid 购自 Sigma 公司,RAW264.7 购自 ATCC,逆转录和 Real-time 扩增系统分别购自 Invitrogen 和 Applied Biosystems 公司,DEME 和胎牛血清(去内毒素)购自 Gibco 公司,C57BL/6 小鼠来自于美国 City of Hope 医学中心实验动物房。

1.2 方法

1.2.1 RAW264.7 细胞培养及分组 RAW264.7 用含 10% 胎牛血清的 DMEM(高糖)培养基,于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中静置培养。待细胞长至 80% 融合时,接种至 6 孔板,密度为 0.7×10^6 /孔,24 h 后更换为含 0.2% BSA 的 DMEM,培养 24 h 后,再做相应处理。①OA 作用不同时间的处理:对照组加入与实验组等体积的 DMSO,实验组加入 10 μ mol/L OA,与细胞孵育 6、12、24 h。②不同剂量 OA 的处理:对照组加入与实验组等体积的 DMSO,实验组 1 加入 10 μ mol/L OA,实验组 2 加入 20 μ mol/L OA,和细胞共孵育 24 h。③信号通路抑制剂的处理:对照组加入与实验组等体积的 DMSO,实验组中分别加入抑制剂 H89 (10 μ mol/L),SB203580 (10 μ mol/L),BMS-345541 (1 μ mol/L)与细胞孵育 30 min,然后用 OA (10 μ mol/L) 刺激 24 h。

1.2.2 原代枯否细胞的分离、培养及处理 4~5 月龄 C57BL/6 小鼠,经胶原酶 IV 原位灌注肝脏后,摘除肝脏,得到肝脏匀浆。然后,用二部 Percoll 密度梯度离心法分离肝脏枯否细胞^[9]。分离的枯否细胞以 1×10^6 的密度接种于 6 孔板内,培养

于含 10% 胎牛血清(无内毒素)的 DMEM 培养液中,接种 30 min 后,换液,继续培养 24 h。之后更换为含 0.2% BSA 的 DMEM,培养 24 h。OA 作用不同时间的处理:对照组加入与实验组等体积的 DMSO,实验组加入 10 μ mol/L OA,与细胞孵育 3、6、12 h。

1.2.3 Real-time PCR 检测 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 水平的表达 TRI 试剂提取细胞总 RNA。取 2 μ g 总 RNA 根据 SuperScript First-Strand Synthesis System 的操作步骤说明合成 cDNA。以 cDNA 为模板,加入特异性的引物和 2 \times SYB Green 使用 Applied Biosystems 7300 Real-time PCR 仪对其 mRNA 进行扩增。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,PCR 仪内扩增 40 个循环。使用的引物序列如下:M36b4 上游 5'-GCCCTGCACTCTCGCTTTCT-3',下游 5'-CAACTGGGCACCGAGGCAACAGTTG-3';TNF- α 上游 5'-CGCCCTTCCAGAACTCCAGGCG-3',下游 5'-TGCTACGACGTGGGCTACAG-3';IL-1 β 上游 5'-CCTGAAGTCAACTGTGAAATGCC-3',下游 5'-CAGCTTCTCCACAGGCACAATGAG-3'。结果分析:以管家基因 M36b4 作为内参基因,计算各组细胞中相应基因的 $\Delta\Delta$ Ct 值。 $\Delta\Delta$ Ct = (Ct 目的基因 - Ct 管家基因),以目的基因的量(2 - $\Delta\Delta$ Ct)为定量结果进行统计学分析。

1.2.4 Western blot 检测 p38 MAPK 磷酸化表达 在 RAW264.7 细胞或枯否细胞培养基中加入 10 μ mol/L OA 分别作用 15、30、40 min 和 1 h,提取各时相总蛋白,进行蛋白定量。10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白,电印迹转移法将凝胶内的蛋白转至硝酸纤维素膜。5% 脱脂牛奶封闭 1 h,一抗 1:1 000(p38 MAPK)稀释,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBS 洗膜 3 次,加入 HRP 标记的二抗(稀释度 1:1 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,TBS 洗膜后,加 ECL 化学发光试剂,压片曝光。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graphpad Prism5 统计分析软件,各组均数的比较行单因素方差分析。

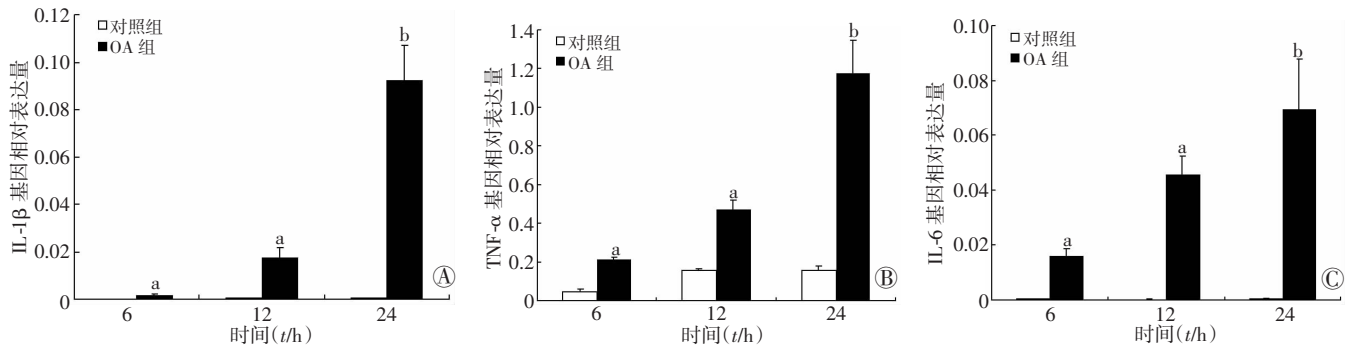
2 结果

2.1 OA 作用不同时间对 RAW264.7 细胞和枯否细胞 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达的诱导

Real-time PCR 的结果表明,OA (10 μ mol/L) 处理 RAW264.7 细胞后的 6、12 和 24 h,IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达较对照组均显著增高(图 1)。在 OA 刺激 24 h 时,IL-1 β 、IL-6 的转录被诱导增加了 100 倍以上,TNF- α 的表达增强了 10 倍以上。与 RAW264.7 细胞结果相似,OA(10 μ mol/L) 刺激枯否细胞 3 h 后也可诱导 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达(图 2)。

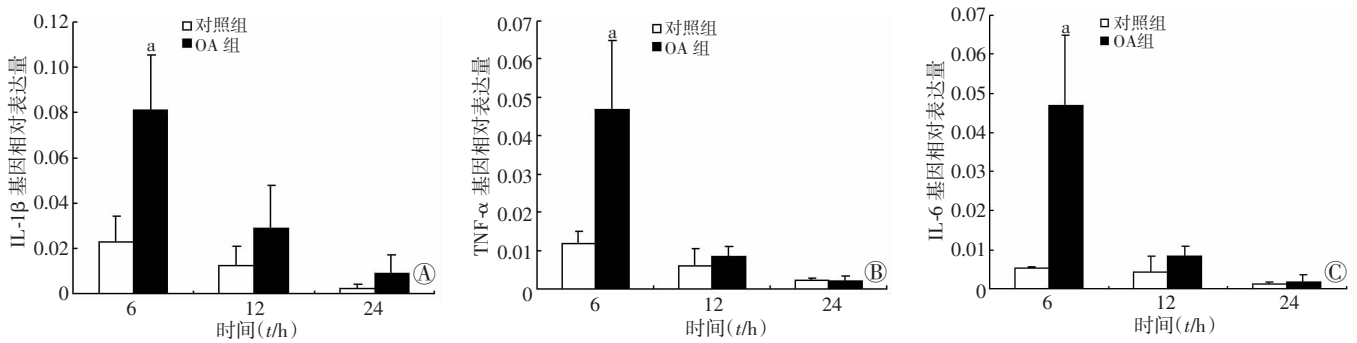
2.2 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 抑制 OA 诱导的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达

Real-time 结果表明用 PKA 的抑制剂 H89 或 NF- κ B 的抑制剂 BMS-345541 预处理 RAW264.7 细胞后,不抑制 OA 诱导的炎症因子的表达(图 3、4)。p38 特异性的抑制剂 SB203580 预处理 RAW264.7 后,几乎完全抑制了 OA 刺激的炎症因子的生成(图 5)。



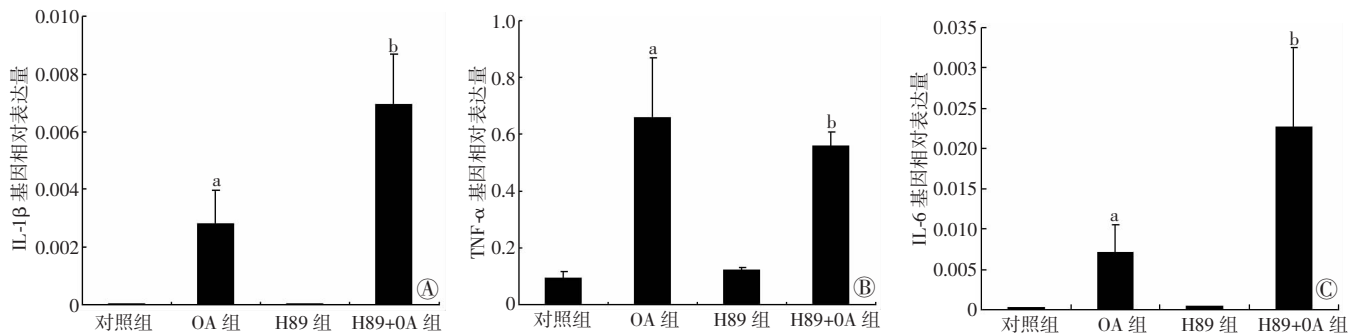
a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$, 与对照组比较 A: IL-1 β ; B: TNF- α ; C: IL-6

图1 Real-time PCR 检测 OA 作用不同时间 RAW264.7 细胞 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 的表达



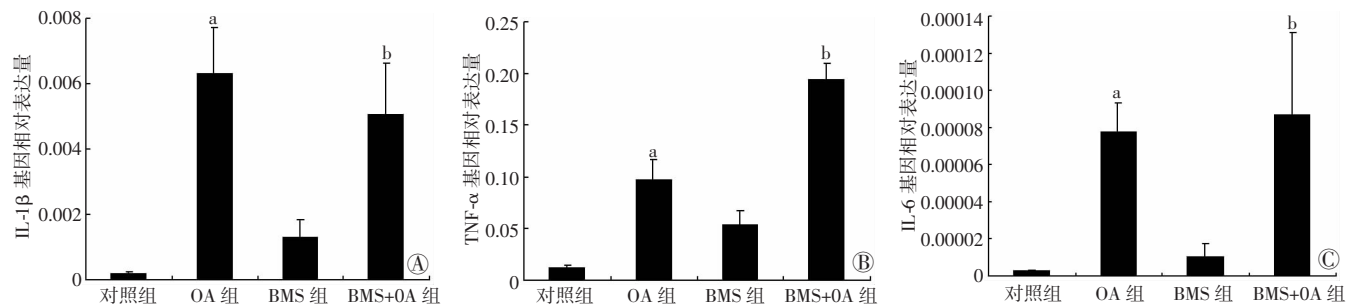
a: $P < 0.05$, 与对照组比较 A: IL-1 β ; B: TNF- α ; C: IL-6

图2 Real-time PCR 检测 OA 作用不同时间桔否细胞 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 的表达



a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, 与 H89 组比较 A: IL-1 β ; B: TNF- α ; C: IL-6

图3 Real-time PCR 检测在 RAW264.7 细胞中 H89 对 OA 诱导的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达的影响



a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, 与 BMS 组比较 A: IL-1 β ; B: TNF- α ; C: IL-6

图4 Real-time PCR 检测在 RAW264.7 细胞中 BMS-345541 对 OA 诱导的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达的影响

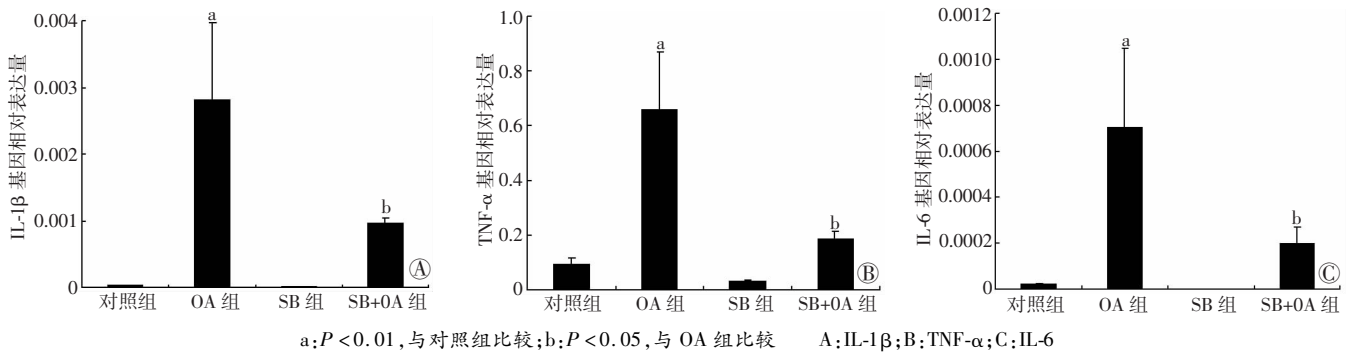
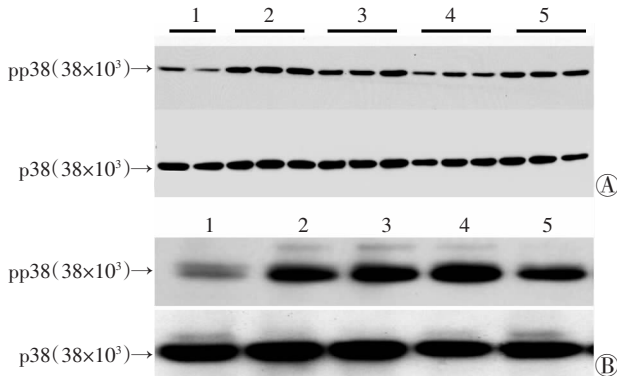


图5 Real-time PCR 检测在 RAW264.7 细胞中 SB203580 对 OA 诱导的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达的影响

2.3 OA 增强巨噬细胞 p38 MAPK 的磷酸化水平

RAW264.7 细胞和枯否细胞经 OA (10 μ mol/L) 分别刺激 15、30、45 min 和 1 h, 提取各组总蛋白, Western blot 检测 p38 MAPK 磷酸化水平。结果表明, 与对照组比较, OA 作用的不同时间段内, p38 MAPK 磷酸化水平均增强 (图 6)。这提示 OA 能活化巨噬细胞内的 p38 信号传导途径。



A: RAW264.7 细胞; B: 枯否细胞 1-5: OA 作用 0、15、30、40、60 min
图 6 Western blot 检测 OA 作用不同时间 RAW264.7 细胞和枯否细胞中 p38 的磷酸化水平

3 讨论

已证实 TGR5 活化后可以在体内外抑制 LPS 诱导的炎症因子的表达^[1]。本研究表明 TGR5 被 OA 激活后, 在无 LPS 的刺激下, 可上调巨噬细胞 L-1 β 、IL-6 和 TNF- α 转录水平的表达, 从而表明 TGR5 对炎症因子的表达具有双重调节作用。

TGR5 活化后, 激活 Gs-蛋白, 进而升高细胞内 cAMP 的浓度, 激活下游的 PKA 蛋白激酶, 从而抑制 LPS 诱导的炎症因子的表达, 这一 TGR5 下游信号传导通路已被证实^[1]。而 NF- κ B 是被公认的在 LPS 诱导的炎症因子生成中发挥重要作用的转录因子^[10-12]。因此, 我们首先探讨 PKA 和 NF- κ B 是否参与了炎症因子的生成。PKA 和 NF- κ B 这两种抑制剂不能阻止

TGR5 对 L-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达的上调作用, 表明 PKA 和 NF- κ B 这两条信号途径不参与 TGR5 诱导的炎症因子的转录。从而提示 TGR5 诱导的 L-1 β 、IL-6 和 TNF- α 转录, 与 TGR5 抑制 LPS 诱导炎症因子表达的信号通路有所不同。

MAPK 是介导细胞外信号引起细胞核反应的极其重要的信号系统, 已证明在哺乳动物中存在 4 个 MAPK 成员, 即 ERK、JNK/SAPK、p38 和 ERK5/BMK1 等 MAPK 亚族, 其中 p38 MAPK 通路主要对炎性细胞因子和多种类型的细胞应激信号进行转导, 大量研究表明阻断 p38 级联能减轻炎症反应^[13-14]。我们的实验结果也证实, p38 的特异性抑制剂几乎完全抑制了 TGR5 诱导的 L-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达, 提示 p38 是引起该反应的重要激酶。而且用 OA 激活 RAW264.7 和枯否细胞膜上的 TGR5, 可以检测到 p38 的磷酸化水平在所观察的时间段内均有明显升高, 也说明 TGR5 活化后, 确实可以激活 p38 MAPK 的信号传导途径。研究表明, p38 MAPK 被激活后, 可活化转录激活因子 (transcription factor, ATF) 家族、CREB 等转录因子^[15-16]。而在 L-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的基因上游调控区域内包含有这些转录因子的结合位点^[17-19]。因此我们推测, TGR5 活化后, 可以通过激活 p38 MAPK, 进而激活其下游某个或某些转录因子, 促进其结合于 L-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的基因上游调控区域, 从而诱导了这 3 种炎症因子的表达。

G 蛋白偶联受体对于炎症因子的双重作用也见于其他受体。比如 β_2 雄激素受体 (β_2 adrenergic receptor, β_2 AR)。在 LPS 存在的条件下, β_2 AR 可以通过抑制 NF- κ B 的活性而抑制炎症因子的表达。然而, β_2 AR 本身可以升高巨噬细胞内炎症因子的表达, 该作用是通过 MAPK 信号通路实现的, 而不依赖与 NF- κ B 途径^[20]。

肝脏枯否细胞是炎症因子如 L-1 β 、IL-6 和 TNF- α

的主要来源细胞。有研究报道胆酸可以诱导肝脏的炎症反应^[21],根据本实验的结果,我们推测,作为胆酸的内源性G蛋白受体,TGR5有可能介导了胆酸诱导的炎症因子的生成,从而参与了肝脏的相关功能。在肝脏中,TGR5的具体生理作用尚需进一步研究。

综上所述,本研究证实了在无任何刺激下,TGR5可诱导炎症因子L-1 β 、IL-6和TNF- α 的生成,该机制可能与TGR5激活的p38 MAPK通路有关。TGR5有可能介导了胆酸诱导的炎症因子L-1 β 、IL-6和TNF- α 的生成,从而参与肝脏的炎症反应。

参考文献:

- [1] Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, *et al.* A G protein-coupled receptor responsive to bile acids [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(11): 9435 - 9440.
- [2] Keitel V, Reinehr R, Gatsios P, *et al.* The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells [J]. *Hepatology*, 2007, 45(3): 695 - 704.
- [3] Vassileva G, Golovko A, Markowitz L, *et al.* Targeted deletion of Gpbar1 protects mice from cholesterol gallstone formation [J]. *Biochem J*, 2006, 398(3): 423 - 430.
- [4] Watanabe M, Houten S M, Matakai C, *et al.* Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation [J]. *Nature*, 2006, 439(7075): 484 - 489.
- [5] Thomas C, Gioiello A, Noriega L, *et al.* TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis [J]. *Cell Metab*, 2009, 10(3): 167 - 177.
- [6] Maruyama T, Tanaka K, Suzuki J, *et al.* Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/M-Bar) in mice [J]. *J Endocrinol*, 2006, 191(1): 197 - 205.
- [7] Keitel V, Donner M, Winandy S, *et al.* Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 372(1): 78 - 84.
- [8] Wang Y D, Chen W D, Yu D, *et al.* The G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cells (NF-kappaB) in mice [J]. *Hepatology*, 2011, 54(4): 1421 - 1432.
- [9] Fail P A, Anderson S A. Monitoring endocrine function in males: using intra-atrial cannulas to monitor plasma hormonal dynamics in toxicology experiments [M]//Costa L G, Hodgson E, Lawrence D A, *et al.* *Current Protocols Toxicology*. New York: John Wiley & Sons, 2002, Chapter 16: Unit16.5.
- [10] Hall A J, Vos H L, Bertina R M. Lipopolysaccharide induction of tissue factor in THP-1 cells involves Jun protein phosphorylation and nuclear factor kappaB nuclear translocation [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(1): 376 - 383.
- [11] Baldwin A S Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights [J]. *Annu Rev Immunol*, 1996, 14: 649 - 683.
- [12] 杨筱祎,李力. NF- κ B 在小鼠感染性早产发生中作用的研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(2): 164 - 166.
- [13] Chen S R, Xu X Z, Wang Y H, *et al.* Icariin derivative inhibits inflammation through suppression of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(8): 1307 - 1313.
- [14] 倪志宇,丛斌,董玫,等. 八肽胆囊收缩素通过 p38MAPK 通路抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 IL-1 β 表达 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(7): 971 - 975.
- [15] Deak M, Clifton A D, Lucocq L M, *et al.* Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB [J]. *EMBO J*, 1998, 17(15): 4426 - 4441.
- [16] Morton S, Davis R J, Cohen P. Signalling pathways involved in multisite phosphorylation of the transcription factor ATF-2 [J]. *FEBS Lett*, 2004, 572(1/3): 177 - 183.
- [17] Sano M, Fukuda K, Sato T, *et al.* ERK and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts [J]. *Circ Res*, 2001, 89(8): 661 - 669.
- [18] Altmayr F, Jusek G, Holzmann B. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide causes repression of tumor necrosis factor-alpha transcription and suppression of ATF-2 promoter recruitment in Toll-like receptor-stimulated dendritic cells [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(6): 3525 - 3531.
- [19] Hershko D D, Robb B W, Luo G J, *et al.* Sodium arsenite downregulates transcriptional activity of AP-1 and CRE binding proteins in IL-1 beta-treated Caco-2 cells by increasing the expression of the transcriptional repressor CREMalpha [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 90(3): 627 - 640.
- [20] Tan K S, Nackley A G, Satterfield K, *et al.* Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms [J]. *Cell Signal*, 2007, 19(2): 251 - 260.
- [21] Miyake J H, Wang S L, Davis R A. Bile acid induction of cytokine expression by macrophages correlates with repression of hepatic cholesterol 7alpha-hydroxylase [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(29): 21805 - 21808.

(收稿:2011-11-13;修回:2011-12-19)

(编辑 汪勤俭)