文章编号:1000-5404(2005)10-0935-03

论著

# 外源性一氧化氮对LPS诱导的人单核巨噬细胞株NFκB活性的影响

吴学玲,钱桂生,徐德斌,侯一峰,陈维中 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

**提 要: 目的** 研究NO供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)对脂多糖(LPS)诱导的人单核巨噬细胞株U937核转录因子κB(NFκB)活性的影响。**方法** 佛波脂(PMA)诱导U937成熟后分为4组,分别为正常对照组(不给任何药物)、LPS组(10 ng/ml LPS + 100 ng/ml rhLBP)、低剂量SNP组(LPS + rhLBP + 50 mol/L SNP)、高剂量SNP组(LPS + rhLBP + 500 mol/L SNP)。用免疫细胞化学染色图像分析法和蛋白质定量分析法(Western blotting)测定U937细胞中NFκB的活性;ELISA测定U937细胞培养上清液中TNF-α的含量。**结果** LPS刺激后NFκB P65进入核内,而LBP抑制肽组核易位明显减少。低、高剂量SNP组P65胞浆灰度比较LPS组明显减小($P<0.01$, $P<0.05$)。各SNP组细胞核P65的$D$(450)较LPS组降低;各抑制肽组细胞浆P65的$D$(450)较LPS组升高。低、高剂量SNP组TNF-α较LPS组显著降低(均$P<0.05$)。**结论** SNP能显著抑制LPS诱导的U937细胞NFκB的活化,并降低其TNF-α的释放。表明SNP对急性肺损伤或脓毒血征可能具有潜在的预防和早期治疗作用。

**关键词**: 一氧化氮;脂多糖类;核转录因子κB;肿瘤坏死因子α
**中图法分类号**: R329.24; R392.11; R446.61 **文献标识码**: A

# Effects of exogenous nitric oxide on NFκB activity of U937 induced by lipopolysacchride

WU Xue-ling, QIAN Gui-sheng, XU De-bin, HOU Yi-feng, CHEN Wei-zhong (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of exogenous nitric oxide(NO) on NFκB activity and TNF-α production of U937 induced by LPS. **Methods** U937, which was induced by PMA and became mature, was divided into 4 groups: normal control without any treatment, LPS group treated with 10 ng/ml LPS and 100 ng/ml rhLBP, low-dose exogenous NO(SNP) group treated with LPS and rhLBP and 50 mol/L SNP, and high-dose SNP group treated with LPS and rhLBP and 500 mol/L SNP. The activity of NFκB was evaluated by immunochemical staining and image analysis and Western blotting. The concentration of TNF-α in the supernatant of U937 cell culture was detected by ELISA. **Results** The activity of NFκB and the concentration of TNF-α in SNP treated groups were significantly lower than those in LPS and LBP treated group, but higher than those in control group. **Conclusion** LPS can activate NFκB through LBP and induce the release of TNF-α. SNP can reduce the release of TNF-α, which may be through inhibiting the activation of NFκB. Exogenous NO might have a potential value in the prevention and treatment of acute lung injury or sepsis.

**Key words**: nitric oxide; lipopolysacchride; nuclear factor κB; TNF-α

内毒素(lipopolysaccharide, LPS)进入机体经过一系列细胞信号转导途径激活核转录因子κB(nuclear factor kappa B, NFκB),产生大量的炎症因子如TNF-α、IL-6等,导致过度炎症反应的发生,引起脓毒血症或者急性肺损伤。研究认为巨噬细胞可能在其中起着重要作用[1,2]。近年研究证实,活化的巨噬细胞能产生大量的内源性一氧化氮(NO)[3]。在炎症性疾病中,NO处于有双刃剑的作用。不同损伤因素(感染、免疫、化学机械及放射)所引起的大量内源性NO可以是炎症启动子,参与炎症损伤过程。小量外源性NO又可以是一抗炎因子,保护或抑制炎症反应所致的组织细胞损伤,但在哪一环节抑制细菌毒素的功能(结合、转运或清除)尚不明确。为此我们拟探讨一氧化氮供体SNP对LPS诱导的U937的NFκB活性的影响,为SNP用于脓毒血症、急性肺损伤提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

NO供体SNP为瑞典Uppsala大学陈鲁妮教授惠赠,LPS(*E coliserotype* 0111:B4)、重组人LBP(rhLBP)为Sigma公司产品;NFκB

**基金项目**:国家自然科学基金资助项目(30170366)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170366)
**作者简介**:吴学玲(1976-),女,山东省临沂市人,博士研究生,医师,主要从事ARDS机制方面的研究。电话:(023)68755320
**通讯作者**:钱桂生,电话:(023)68755603,E-mail:qinggs@mail.tmmu.com.cn
**收稿日期**:2004-09-06;**修回日期**:2005-01-29

P65多克隆抗体为Santa Cruz公司产品。TNF-α ELISA检测试剂盒为晶美生物工程公司产品;SP kit为北京中山公司产品。

### 1.2 U937细胞分组

U937为徐智博士惠赠。PMA诱导U937成熟后分为4组,分别为正常对照组(不给任何药物)、LPS组(同时给予10 ng/ml LPS和100 ng/ml rhLBP)、低剂量SNP组(给予LPS和rhLBP后10 min给予50 mol/L SNP)、高剂量SNP组(给予LPS和rhLBP后10 min给予500 mol/L SNP)。

### 1.3 免疫细胞化学

采用S-P法:U937细胞在改良的含10%新生小牛血清1640培养基(含2 mmol/L谷氨酰氨、10 mmol/L HEPES, 1 mmol/L丙酮酸钠,4 500 mg/L葡萄糖及1 500 mg/L碳酸氢钠)中。给予10 ng/ml的PMA诱导细胞分化和成熟后用于实验[4]。成熟的贴壁细胞悬浮于无血清培养液中。

按前述方案把细胞分为4组,每组10孔。在37 ℃、5%的$CO_2$培养箱中分别孵育2 h,终止培养后,PBS清洗2次。4%多聚甲醇中固定20 min,3%的$H_2O_2$作用去除内源性过氧化物酶,羊血清37 ℃封闭30 min,加1:100稀释的NFκB P65 4 ℃过夜,加生物素标记的二抗37 ℃ 2 h,链酶卵白素辣根过氧化物酶37 ℃ 30 min。除羊血清封闭外,以上步骤后均用PBS洗3次,5 min/次。DAB显色,梯度乙醇脱水、透明、中性树胶封片,显微镜下照相。每张片随机约取100个细胞,用GD-8型图像分析系统对每个细胞的胞核与胞浆的灰度值进行分析,计算核浆灰度比值。

### 1.4 细胞浆和核蛋白提取物中NFκB蛋白定量(Western blotting)

1.4.1 细胞浆和核蛋白的提取 核蛋白的提取按Dignam等[5]报道的方法加以改良,细胞经PBS洗涤后,悬浮在缓冲液A 400 μl中(pH 7.9, Hepes-NaOH 10 mmol/L、EGTA 0.05 mmol/L、KCl 10 mmol/L、EDTA 0.1 mmol/L、$MgCl_2$ 1.5 mmol/L,临用时每ml加入1 mmol/L的PMSF和DTT各10 μl,10 μg/ml Leupeptin、4 μg/ml Aprotinin和1.5 μg/ml Pepstatin 5 μl),混匀后冰置15 min,加入10% NP-40 25 μl,剧烈震荡10 s, 12 000×$g$、4 ℃离心10 s,上清为胞浆蛋白。PBS洗沉淀1次,12 000×$g$、4 ℃离心10 s,弃上清,加入50 μl缓冲液B(Hepes-NaOH 20 mmol/L、EGTA 0.05 mol/L、NaCl 0.42 mmol/L、EDTA 0.2 mmol/L、$MgCl_2$ 1.5 mmol/L、甘油25%,临用时每ml加入0.5 mmol/L的PMSF 2.5 μl、0.5 mmol/L的DTT 5 μl、4 μg/ml Leupeptin、1 μg/ml Aprotinin和0.5 μg/ml Pepstatin 2 μl),冰置30 min, 4 ℃、12 000×$g$离心2 min,上清为核蛋白。

1.4.2 蛋白印迹 20 μg蛋白在10%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(恒压60 V 1 h,90 V 2 h),去除积层胶,分离胶和同等面积的PVDF膜浸泡于转移缓冲液平衡30 min,叠放于半干转移仪上。电转法将蛋白质从SDS聚丙烯酰胺凝胶转移至PVDF膜,转膜电压为15 V,时间为25 min。转膜结束后,将PVDF膜取出,进行免疫印迹。依次放入含有一抗、二抗的杂交袋中。加入DAB显色,将免疫印迹所得结果经图像扫描分析,以灰度值为P65相对含量。

### 1.5 ELISA法测定人单核巨噬细胞株上清液TNF-α含量

U937细胞诱导成熟方法同前。成熟细胞悬浮于无血清培养液中,以1×$10^6$/孔加入96孔细胞培养板中,按前述细胞分组细胞随机分为5组,每组10孔。在37 ℃、50 ml/L的$CO_2$培养箱中孵育1 h,离心收集上清液,储存于-70 ℃待测。按ELISA试剂盒说明测定TNF-α水平,每个样品及不同浓度标准品均设复孔,在450 nm波长下读取各孔吸光度值$D$,计算机自动绘制标准曲线并给出相应的值,以pg/L表示。

### 1.6 统计学处理

实验结果以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS10.0统计软件行方差分析及均数间多重比较($q$检验)。

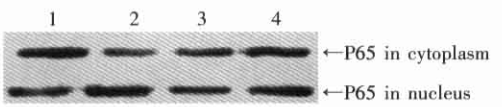
## 2 结果

### 2.1 免疫细胞化学染色图形定量分析

正常对照组:P65抗体(棕黄色颗粒)主要位于胞浆。LPS组:棕黄色大部分位于细胞核内。SNP组:棕黄色颗粒部分胞浆内,部分在细胞核内,即LPS刺激后NFκB P65进入核内,SNP干预后核易位明显减少。低剂量、高剂量SNP组P65胞浆灰度比分别为(0.49±0.06)和(1.10±0.12),较LPS组(1.34±0.12)明显减小($P<0.01$, $P<0.05$)。

### 2.2 细胞核蛋白提取物中NFκB(P65)蛋白定量

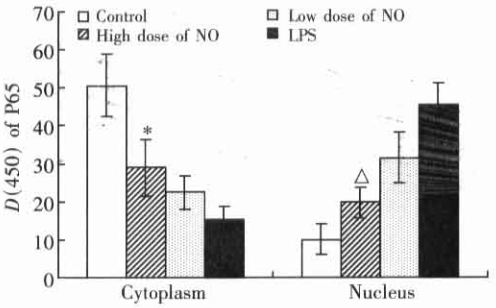
SNP干预组细胞浆P65较LPS组灰度值增加,但小于正常组。SNP干预组细胞核P65较LPS组灰度值减少,但大于正常组(图1、2)。




1: Control; 2: LPS; 3: Low dose of NO; 4: High dose of NO

**图1 P65蛋白印迹**

**Fig 1 Western blotting of P65**




*: $P<0.05$, *vs* LPS group in cytoplasm; △: $P<0.05$, *vs* LPS group in nucleus

**图2 细胞浆和细胞核P65蛋白定量**

**Fig 2 OD of P65 in cytoplasm and nucleus**

### 2.3 培养液上清TNF-α浓度的变化

低剂量、高剂量SNP干预组TNF-α浓度分别为(71.5±7.75)和(105.5±2.56),较LPS组(128.67±39.67)显著降低($P<0.05$)。

## 3　讨论

NO 是一种无机小分子，参与细胞内信号转导，具有舒张动脉、降低血小板粘滞性，减少粘附分子的表达等作用。内毒素可刺激巨噬细胞产生 NO，启动炎症反应。但早期给予外源性 NO 吸入，动物对静脉注射 LPS 不产生或产生轻微的内脏炎症反应。但若待组织损伤已形成时，该保护反应减弱。说明 NO 对 LPS 致炎通路有阻断作用，但其具体机制尚不明确。

NFκB 是细胞中一个重要的转录因子，它调控的基因编码急性时相蛋白、细胞因子、免疫相关分子等，同时与抗凋亡基因的诱导表达有关。在未受刺激的细胞中，NFκB 与抑制蛋白 IκB 形成复合体存在于胞浆内。在 LPS、过敏原、病毒感染和一些前炎症细胞因子等作用下 IκB 磷酸化并从 NFκB 上解离下来，活化的 NFκB 转移入核内（核易位）与基因上特定的 κB 序列结合后，启动基因的转录[6]。参与多种炎症介质（如 TNF-α、IL-6、IL-1 等）的表达和调控[7]，诱发炎症反应。因此本实验以 NFκB 为研究靶点。

本研究应用免疫细胞化学的方法来进行 NFκB 的核定位，并把图形进行定量分析，有研究证实该方法的结果与经典的 EMSA 检测结果趋势一致能定量反映 NFκB 的活化程度，结果可靠[8]。NFκB 的活化通常在 LPS 作用后 2 h 达到高峰[9]，因此本研究选择该时相点来进行研究。

实验中显示在脂多糖刺激后 NFκB 即可活化，从胞浆中转移入胞核。而小剂量的 SNP 则能减少 NFκB 的核易位。这一作用只有在早期应用时才会有显著效果。分析原因可能是 SNP 早期应用后，在 NFκB 尚未过度活化时阻止了或减慢其活化。而在 LPS 作用的后期机体内的 NFκB 已过度活化，此时应用 SNP，则作用不显著。同时本研究表明，SNP 能显著抑制 LPS 诱导的 TNF-α 的产生，但在 LPS 作用的后期应用的效果不显著，这与 SNP 对 NFκB 的作用机制相一致，由于后期 SNP 已无法抑制 NFκB 的活化，因此也无法阻止炎症介质的生成。这可能是因为 TNF-α 是早期表达的致炎因子，其表达峰值在 LPS 作用后的 1 h[10]。SNP 对 NFκB 活化以及对 TNF-α 生成具有抑制作用，且 NO 有抗微生物效应：包括细胞内寄生虫、分枝杆菌和普通的 ICU 病原菌。因此 SNP 可能对急性肺损伤和脓毒血症具有潜在的预防和早期治疗作用。

## 参考文献：


[1] 彭代智，黄文华，黎　鳌，等. 巨噬细胞在严重烧伤后免疫功能紊乱中的作用[J]. 中华外科杂志，1994，32(5)：310－313.

[2] Sparkes B G. Immunological responses to thermal injury[J]. Burn，1997，23(2)：106－113.

[3] Skidgel R A，Gao X P，Brovkovych V，*et al*. Nitric oxide stimulates macrophage inflammatory protein-2 expression in sepsis[J]. J Immunol，2002，169(4)：2093－2101.

[4] Verhoeckx K C，Bijlsma S，de Groene E M，*et al*. A combination of proteomics，principal component analysis and transcriptomics is a powerful tool for the identification of biomarkers for macrophage maturation in the U937 cell line[J]. Proteomics，2004，4(4)：1014－1028.

[5] Dignam J D，Lebovitz R M，Roeder R G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei [J]. Nucleic Acids Res，1983，11(5)：1475－1489.

[6] Lappas M，Permezel M，Georgiou H M，*et al*. Nuclear factor kappa B regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues *in vitro* [J]. Biol Reprod，2002，67(2)：668－673.

[7] Blackwell T S，Christman J W. The role of nuclear factor kappa B in cytokine gene regulation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol，1997，17(1)：3－9.

[8] 张桂林，刘尚喜，邓　燕，等. 免疫化学染色图像分析法检测细胞核因子 κB[J]. 第一军医大学学报，2003，23(5)：498－500.

[9] Schauvliege R，Vanrobaeys J，Schotte P，*et al*. Caspase-11 gene expression in response to lipopolysaccharide and interferon-gamma requires nuclear factor-kappa B and signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 [J]. J Biol Chem，2002，277(44)：41624－41630.

[10] 张　青，徐剑铖，毛宝龄，等. 内毒素致伤大鼠肺组织 TNF-α、IL-6 的 mRNA 表达及 TNF、IL-6 活化研究[J]. 中国危重病急救医学，2001，13(9)：523－526.


（编辑　陈聪连）

## 参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中，引用英文文献的比例很高，但有不少作者将英、美人的姓名搞错，以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是：名-名-姓，"名"可以有 1，2 个或 3 个，但"姓"只有 1 个。因此，从书籍或期刊中的姓名转录到文献时，要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的；"名"可以缩写，用第一个字母大写，不用缩写点。数据库在著录作者姓名时，已经调整为姓-名-名，可照录。

例如：John Quincy Public 写为 Public J Q。

本刊编辑部