文章编号:1000-5404(2005)12-1223-03

论著

一氧化氮调节脂多糖致炎大鼠肺泡巨噬细胞糖皮质激素受体功能的研究

钱 频,张 芳,钱桂生,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 研究肺泡巨噬细胞在脂多糖(LPS)作用条件下一氧化氮供体(SNP)对糖皮质激素受体(GR)功能的调节作用。**方法** 将GR荧光表达质粒pGFP-GR转染大鼠肺泡巨噬细胞,经LPS和SNP作用后,荧光显微镜观察质粒表达产物GFP-GR核移位情况;相对荧光素酶法检测GR转录激活活性;EMSA检测检测细胞NF-κB活性。**结果** 500 μmol/L SNP作用2 h出现GFP-GR核移位,同时GR转录激活活性显著增强,NF-κB活性被显著抑制。运用GR特异性拮抗剂RU486后,NF-κB活性抑制现象消失。**结论** 肺泡巨噬细胞在致炎因子作用条件下,一氧化氮供体(500 μmol/L SNP)通过活化GR发挥抗炎活性。

关键词: 一氧化氮供体;糖皮质激素受体;NF-κB;转录激活活性

中图法分类号: R364.5; R392.11; R914.3 **文献标识码:** A

Regulation of nitric oxide on glucocorticoid receptor function in rat alveolar macrophages treated by LPS *in vitro*

QIAN Pin, ZHANG Fang, QIAN Gui-sheng, CHEN Wei-zhong (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of nitric oxide donor (SNP) on glucocorticoid receptor function in condition of cell inflammation. **Methods** After fluorescence expression plasmid pGFP-GR transfected rat alveolar macrophges (AMs), nuclear translocation of GFP-GR following to lipopolysaccharide (LPS) and SNP treatment was observed through fluorescence microscope. The transcriptional activation activity of GR was evaluated by the method of relative activity of luciferase. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were used to measure the activity of NF-κB. **Results** GFP-GR showed nuclear translocation in 2 h after nitric oxide donor (500 μmol/L SNP) treatment, and the transcriptional activation activity of GR increased and the activity of NF-κB decreased remarkedly. The phenomena of depressed activity of NF-κB disappeared after the addition of GR special antagonism RU486. **Conclusion** Nitric oxide donor (500 μmol/L SNP) exerts anti-inflammatory effect through GR activation in condition of cell inflammation.

Key words: nitric oxide donor; glucocorticoid receptor; NF-κB; transcriptional activation activity

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种多功能的可溶性气体信号分子,具有广泛的生物学功能,如:舒张血管、抑制血小板凝聚、杀伤肿瘤细胞和病原微生物;同时NO也是一种免疫调节物质,对炎症反应具有调节作用,在一定条件下,对器官功能具有保护作用[1]。吸入性NO用于急性肺损伤的临床治疗已被誉为急性呼吸窘迫综合征(adult respiratory distress syndrome, ARDS)治疗的重要发展[2]。糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)是激素核受体家族中的一个主要成员,在机体应激反应时发挥重要的抗炎和细胞保护效应。有研究结果表明:吸入性NO对肺脏的保护作用和GR的抗炎作用之间有着关联[3]。本研究以脂多糖(LPS)作用大鼠肺泡巨噬细胞(AMs)为炎症条件下细胞模型,观察不同浓度NO供体(NO donor)对GR核移位以及转录激活功能的影响,探讨外源性NO对GR抗炎活性的

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970329)
Supported by the National Nature Science Foundation of China (39970329)

作者简介: 钱 频(1976-),女,上海市人,主治医师,主要从事肺心病等临床疾病的超声诊断和发病机制方面的研究,现在超声诊断科工作。电话:(023)68755320

通讯作者: 张 芳,电话:(023)65230729

收稿日期: 2004-12-17; **修回日期:** 2005-04-14

调控机制，为吸入性 NO 治疗 ARDS 的临床合理应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM 培养基，胎牛血清(GIBCO 公司)；NO 供体(sodium nitroprusside, SNP)由瑞典苏普萨拉大学陈鲁妮教授惠赠；质粒 pGFP-GR、报告质粒 pGRE-TK-Luc 由美国哥伦比亚医学院 Galigniana 教授惠赠；FuGene 6 非脂质体转染试剂 (Biochem 公司)；β-半乳糖苷酶表达质粒 pCMV-β-Gal(Clotech 公司)；荧光素酶及 β-Gal 活性检测试剂盒(Promega 公司)；γ-^{32}P-ATP(北京亚辉公司)；Gel shift assay Kit(Promega 公司)；荧光素酶及 β-Gal 活性检测所用 HTS 7000 Bio Assay Reader (Perkin Elmer 公司)；垂直电泳仪、凝胶图像分析仪(BIO-RAD 公司)。

1.2 大鼠肺泡巨噬细胞的分离培养

Wistar 大鼠 10 只，雌雄不拘，体质量 150～180 g，购自第三军医大学实验动物中心。按文献[4]方法，采用支气管肺泡灌洗获取肺泡巨噬细胞(AMs)。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基悬浮后，5% CO_2、37 ℃条件下贴壁 2 h。弃上清，回收贴壁 AMs，台盼蓝染色蓝染的 AMs < 5% 可使用。

1.3 质粒 pGFP-GR 转染大鼠 AMs

将贴壁良好的大鼠 AMs 消化后，用无血清培养基调整细胞数量为 5×10^6/ml。取 2 ml 加入纯化的 pGFP-GR 质粒 4 μg、FuGene 6 试剂 8 μl，混匀后于培养箱中培养 12 h。弃去转染液，更换含浓度为 400 mg/L 的 G418 培养基，培养 7 d 后用于实验。

1.4 观察质粒 pGFP-GR 表达产物的核移位

用含有 LPS(100 ng/ml)和不同浓度 SNP(50、250、500 μmol/L)的无血清培养基刺激转染 pGFP-GR 的 AMs 2 h，荧光显微镜下观察质粒表达产物 GFP-GR 的核移位情况。

1.5 相对荧光素酶法检测 GR 转录激活活性

将转染 pGFP-GR 的 AMs 接种于 6 孔培养板，每孔细胞数约为 1×10^6。报告质粒 pGRE-tk-luc 和内参照质粒 pCMV-β-Gal 各 1.0、0.1 μg 与共转染 AMs(方法同 1.3)。转染细胞随机分为：正常对照组(加等量生理盐水)、LPS 组(用 100 ng/ml LPS 刺激)、LPS+ SNP 组(用 100 ng/ml LPS 和不同浓度 SNP 50、250、500 μmol/L 刺激)，刺激 2 h 后收集细胞。按照荧光素酶及 β-Gal 活性检测试剂盒说明书检测二者活性，二者比值为相对荧光强度(relative luciferase activity, RLA)，代表 GR 转录激活活性。

1.6 NF-κB 活性检测

NF-κB 探针序列参考文献[5](P1：5′-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3′，P2：5′-TCAACTCCGCTGAAAGGGTCCG-3′)，由上海生工公司合成。探针标记和核蛋白的抽提按 Gel shift assay Kit 说明书进行。取 5 μg 核蛋白，DNA 结合缓冲液 10 μl、标记探针 1 μl，加 H_2O 至总反应体积 21 μl，置 37 ℃孵育 30 min，加上样缓冲液 4 μl。细胞分组同 1.5 分组外，另设不加核蛋白的阴性对照组和 LPS+ SNP (500 μmol/L) + RU486 组，RU486 为糖皮质激素受体特异性拮抗剂，使用浓度为 5～10 mol/L。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 ℃放射自显影。电泳滞后带用凝胶图像分析仪进行密度扫描，以其结合带光密度值(INT/mm^2)表示 NF-κB 的活性。

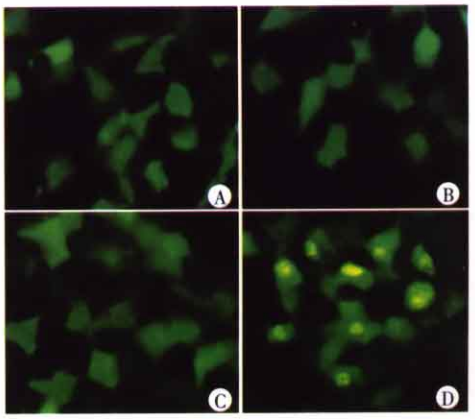
1.7 统计学处理

所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 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。

2 结果

2.1 质粒 pGFP-GR 表达产物的核移位

LPS+ SNP(500 μmol/L)组可见质粒 pGFP-GR 表达产物核移位，而 LPS 组、LPS+ SNP(50 μmol/L)组、LPS+ SNP(250 μmol/L)组未见核移位现象(图 1)。



A：LPS；B：LPS + SNP (50 μmol/L)；C：LPS + SNP (250 μmol/L)；D：LPS + SNP (500 μmol/L)

图 1 SNP 对 GFP-GR 核移位的影响 (荧光显微镜 ×200)

Fig 1 Effects of SNP on GFP-GR nuclear translocation (Fluorescence microscope ×200)

2.2 细胞 GR 转录激活活性检测结果

LPS+ SNP (500 μmol/L)组与对照组、LPS 组比较，细胞 GR 转录激活活性均显著增加($P<0.01$)，LPS+ SNP (50 μmol/L)组、LPS+ SNP (250 μmol/L)组与 LPS 组比较无明显差异($P>0.05$)(表 1)。

表 1 GR 转录激活活性的变化($n=5, \bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of GR transcriptional activation activity ($n=5, \bar{x}\pm s$)

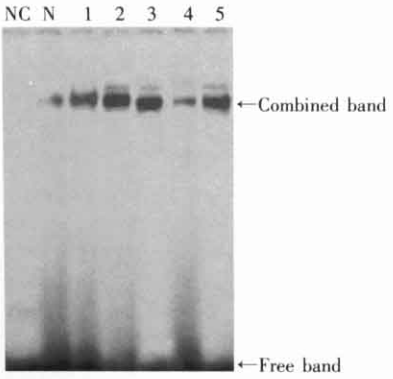
Group	GR transcriptional activation activity
Control	12.5 ± 1.6
LPS	10.5 ± 2.1
LPS + SNP (50 μmol/L)	14.1 ± 3.5
LPS + SNP (250 μmol/L)	12.9 ± 2.5
LPS + SNP (500 μmol/L)	31.6 ± 3.3▲★

▲：$P<0.01$, *vs* control；★：$P<0.01$, *vs* LPS

2.3 NF-κB 活性检测结果

LPS+ SNP (500 μmol/L)组(18.1 ± 2.2)与 LPS 组(36.1 ±

4.2)比较，NF-κB 活性显著降低($P<0.01$)，LPS+ SNP (50 μmol/L)组、LPS+ SNP (250 μmol/L)组、LPS+ SNP + RU486 组与 LPS 组比较无明显差异($P>0.05$)(图 2)。



NC: Negative control; N: Normal control; 1: LPS; 2: LPS + SNP (50 μmol/L); 3: LPS + SNP (250 μmol/L); 4: LPS + SNP (500 μmol/L); 5: LPS + SNP + RU486

图 2　SNP 作用后 NF-κB 活性变化

Fig 2　Changes of NF-κB activity after SNP treatment

3　讨论

近年来研究显示，NO 对肺部炎症反应具有调控作用，然而，吸入 NO 对急性肺损伤炎症反应的影响机制尚不清楚，直接影响了 NO 的临床应用。文献[3]报道：吸入 NO 联合糖皮质激素(GC)治疗脓毒血症猪较单独吸入 NO 或使用 GC，更明显地控制肺部和全身炎症反应，提示吸入 NO 有可能上调 GR 表达或活化 GR 来发挥抗炎活性。GR 是体内一种重要的炎症负调控因子。静息状态下，GR 以非活化状态存在于胞浆中；当与 GC 结合后，GR 发生构象改变，与热休克蛋白解离，同源二聚化，激活的 GR 与靶基因 DNA 上糖皮质激素调控元件 (GRE)发生特异性结合，促进多种抑炎基因的转录；同时 GR 可抑制核因子 κB(NF-κB)活化，避免 NF-κB 介导调控的多种炎症因子(如促炎细胞因子、粘附分子基因)的转录。已经证实[6]：在 LPS 作用 AMs 模拟细胞在炎症条件下，GR 活性受抑与 NF-κB 过度活化密切相关，GR 与 NF-κB 活性的动态变化可能是调节细胞炎症反应进程的重要枢纽轴。本研究以 GR/NF-κB 枢纽轴为切入点，探讨细胞在炎症条件下外源性 NO 的免疫调节机制。

由于 NO 灭活代谢转化迅速，于是常采用 NO 供体进行 NO 生物学研究。SNP 是较常用的 NO 供体，进入细胞后需经代谢释放 NO。研究结果显示：在细胞在致炎因子作用条件下，500 μmol/L 的 SNP 作用 2 h 可以使 GFP-GR 核移位，GR 转录激活活性与 LPS 组比较显著增加；其它各组未见核移位现象，GR 转录激活活性与 LPS 组比较无显著差异。表明外源性 NO 对 GR 功能调节呈剂量依赖性。本研究转染质粒 pGFP-GR 表达产物为大鼠 GR 与 GFP 的蛋白融合体，GFP 为示踪绿色荧光蛋白，一般不会影响 GR 的生物活性[7]。GR 转录激活活性是运用体外转录激活报告系统分析测定。此系统中，GR 与报告质粒 pGRE-tk-luc 启动子调控区糖皮质激素调控元件(GRE)结合可活化启动子，导致报告基因荧光素酶 (luciferase)的表达；pCMV-β-Gal 为内参照质粒。通过二者比值，即相对荧光强度来校正荧光素酶活性，以消除转染效率对荧光素酶活性的影响。

本研究通过 EMSA 观察 AMs 在致炎因子作用条件下，不同浓度 SNP 对 NF-κB 活性的影响。结果显示：LPS+ SNP (500 μmol/L)组与 LPS 组比较，NF-κB 活性显著降低($P<0.01$)，其它各组与 LPS 组比较无显著差异。表明外源性 NO 抑制细胞炎症呈剂量依赖性。进一步运用糖皮质激素受体特异性拮抗剂 RU486 后，LPS+ SNP (500 μmol/L)组 NF-κB 活性抑制现象消失。表明炎症条件下，SNP (500 μmol/L)是通过激活 GR，发挥抑制 NF-κB 活性效应。

综上所述，本研究模拟 AMs 在炎症条件下，首次发现一氧化氮供体(500 μmol/L SNP)通过活化 GR 来有效控制细胞炎症反应。该成果为吸入 NO 治疗 ARDS 提供重要的理论依据和临床指导。

参考文献：

[1] 刘少华，徐鑫荣，许　戟，等. 吸入一氧化氮联合反比通气治疗感染性急性呼吸窘迫综合征[J]. 中国危重病急救医学，2003，15(6)：367－369.

[2] Bigatello L M, Hellman J. Inhaled nitric oxide for ARDS: searching for a more focused use[J]. Intensive Care Med, 2003, 9(10): 1623－1625.

[3] Da J P, Chen L N, Goran H. Enhanced anti-inflammatory effects by steroids in a porcine sepsis model[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(12): 1347－1347.

[4] 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.

[5] 王　磊，于丽萍，窦科峰. 大肠杆菌脂多糖诱导大鼠 Kupffer 细胞 NF-κB 激活及其意义[J]. 中国医师杂志，2004，6(1)：16－18.

[6] 钱　频，张　芳，钱桂生，等. 脂多糖作用大鼠肺泡巨噬细胞糖皮质激素受体表达及活性变化[J].第三军医大学学报，2004，26(22)：2042－2044.

[7] 何琪杨，张鸿卿，薛绍白. 活细胞的分子探针——绿色荧光蛋白[J]. 国外医学分子生物学分册，1997，19(6)：279－283.

(编辑　陈聪连)