论著

文章编号:1000-5404(2006)06-0512-03

SR-A受体参与抑制LPS刺激RAW264.7产生炎症因子

徐文岳,吴玉章,王 莉,王惠明,王沂芹,赵婷婷,梁云飞,姜 曼 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨清道夫受体A能否抑制LPS刺激RAW264.7产生炎症因子。**方法** LPS诱导小鼠巨噬细胞株RAW264.7 SR-A受体上调后,用LPS再次刺激,观察SR-A受体的上调能否抑制RAW264.7对LPS的反应,最后采用遗传互补实验观察转染SR-A受体后能否抑制LPS活化NF-κB。**结果** LPS刺激SR-A受体已上调的RAW264.7产生的炎症因子明显下降,而遗传互补实验证实SR-A受体确实能抑制LPS通过TLR4活化NF-κB。**结论** SR-A受体参与负调控LPS对RAW264.7的活化,防止过强的炎症反应。

关键词: LPS; 清道夫受体;RAW264.7;TLR4

中图法分类号: R392.11;R392.12;R631 **文献标识码**: A

Involvement of scavenger receptor A in suppression of RAW264.7 inflammatory cytokines release induced by LPS

XU Wen-yue, WU Yu-zhang, WANG Li, WANG Hui-ming, WANG Yi-qing, ZHAO Ting-ting, LIANG Yun-fei, JIANG Man (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibition role of scavenger receptor A on RAW264.7 inflammatory cytokines release induced by LPS. Methods After scavenger receptor A on RAW264.7 was up-regulated by 10, 100 ng/ml, 1 μg/ml LPS for 16 h, some RAW264.7 were used for mean fluorescence intensity by flow cytometry, and some were re-stimulated by 100 ng/ml LPS for 24 h, then the concentration of both TNF-α and IL-6 in culture supernatants were detected by ELISA. Genetic complementary assay was performed to verify the inhibition role of SR-A on NF-κB induced by LPS. Results LPS of 10, 100 ng/ml and 1 μg/ml could induce the SR-A expression in RAW264.7, coincident with suppression of inflammatory cytokines after re-stimulation with LPS. Genetic complementary assay showed that SR-A could reduce NF-κB activity induced by LPS for 5-folds. Conclusion SR-A could inhibit inflammatory cytokines release of RAW264.7 elicited by LPS.

Key words: LPS; scavenger receptor; RAW264.7; Toll-like receptor 4

清道夫受体SR-A(scavenger receptor A, SR-A)是巨噬细胞上的LPS吞噬受体[1],SR-A敲除小鼠感染革兰阴性细菌后,不能有效地阻止细菌在体内扩散,相对于野生株小鼠更容易引起败血症,提示SR-A受体在机体抵御细菌感染的重要作用[2,3]。然而,SR-A是否能抑制LPS通过TLR4活化巨噬细胞有待于实验的进一步验证。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400437)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400437)

作者简介:徐文岳(1972-),男,浙江省宁波市人,博士研究生,讲师,主要从事天然免疫和炎症方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752234-616

通讯作者:吴玉章,电话:(023)68752680

收稿日期:2005-09-15;**修回日期**:2005-12-31

1 材料与方法

1.1 材料

质粒pcDNA5/FR/TO/mSR-A由Steven博士(University of Kentucky)惠赠,小鼠TLR4/pEF-BOS和MD-2/pEF-BOS来自Miyake K实验室(University of Tokyo),胞内区第712个氨基酸发生突变的功能缺失的TLR4/pFLAG-CMV质粒(mmTLR4)是由Xin博士(Scripps Research Institute)惠赠。NFκB报告质粒NFκB/SEAP和Great EscAPe SEAP Chemiluminescence检测试剂盒均购自Clonetech公司。实验所用*E. Coli* 0111:B4 LPS购自Sigma;IL-6和TNF-α ELISA试剂盒分别是Diaclone和晶美生物有限公司,Lipofectamine 2000和胎牛血清分别购自Invitrogen和Hyclone,RAW264.7和HEK293细胞来自ATCC,保存于本所。

1.2 质粒构建

Xho Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切pcDNA5/FR/TO/mSR-A,1.1×10^3

的插入片段亚克隆至 *Xho* Ⅰ/*Hind* Ⅲ线性化的 pcDNA3.1,获得重组质粒 pcDNA3.1/mSR-A,最后经测序证实。

1.3　细胞的培养、瞬时转染和碱性磷酸酶活性检测

HEK293 和 RAW264.7 细胞均用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养。转染前 1 d,1.2×10^5/孔 HEK293 铺于 24 孔板,当天细胞融合度达到 90% 以上,将 1 μg 质粒和 2.5 μl Lipofectamine 2000 混匀后转染 HEK293 细胞(NF-κB/SEAP 与其他质粒的比例为 1∶10)。24 h 后加入 1 μg/ml 的 LPS 刺激 6 h,收集上清,按 Great EscAPe SEAP Chemiluminescence 检测试剂盒说明书检测上清中的碱性磷酸酶,最后用 Iuminometer 读出碱性磷酸酶活性,即活化的 NF-κB。

1.4　细胞刺激、FACS 和 ELISA 检测

刺激前 1 d,0.5×10^6/孔 RAW264.7 铺于 24 孔板中,次日,加入不同剂量(10、100 ng/ml 和 1 μg/ml)的 LPS 与 RAW264.7 细胞孵育 16 h,一组用 anti-SR-A 抗体(2F8)流式(FACS)检测 RAW264.7 细胞膜上的 SR-A,获得的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI);另一组,在吸去细胞培养上清,用 PBS 洗涤 2 次后,再加 100 ng/ml 的 LPS 再刺激 24 h,收集上清,按照相应的 ELISA 试剂盒说明检测炎症因子 IL-6 和 TNF-α。

2　结果

2.1　LPS 诱导 RAW264.7 细胞膜上 SR-A 的表达

10 ng/ml LPS 刺激 RAW264.7 16 h 后,就能明显地诱导 SR-A 的上调,而且 SR-A 的诱导上调与预刺激的 LPS 量呈明显的正相关。当预处理的 LPS 浓度达到 1 000 ng/ml,能诱导 RAW264.7 表达的 SR-A 上调大约 2 倍(图 1)。

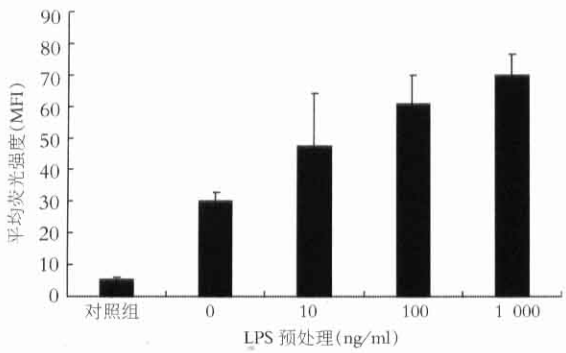
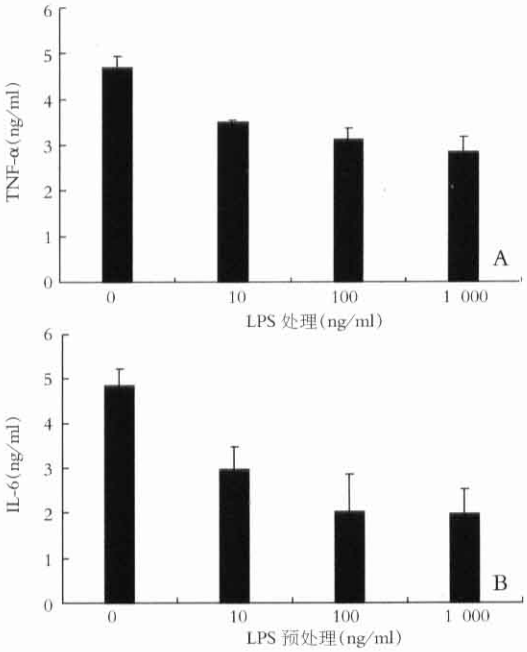


图 1　不同剂量的 LPS 诱导 RAW264.7 细胞上调 SR-A

2.2　SR-A 诱导上调的 RAW264.7 对 LPS 刺激的反应性降低

为了探讨 LPS 诱导上调的 SR-A 能否抑制 RAW264.7 细胞对 LPS 的反应。我们首先用不同剂量(10、100 ng/ml 和 1 μg/ml)的 LPS 与 RAW264.7 细胞孵育 16 h,诱导 SR-A 上调后,再加 100 ng/ml 的 LPS 刺激,收集上清检测炎症因子 IL-6 和 TNF-α,观察 SR-A 上调的 RAW264.7 细胞对 LPS 再次刺激的反应性。结果显示,LPS 再次刺激 SR-A 已诱导上调的 RAW264.7 细胞分泌的炎症因子 IL-6 和 TNF-α 明显降低,而且与 LPS 诱导 RAW264.7 表达的 SR-A 水平密切相关(图 2)。



A: TNF-α; B: IL-6

图 2　不同剂量 LPS 预处理抑制 LPS 的再次刺激诱导 RAW264.7 产生 TNF-α 和 IL-6

2.3　SR-A 受体抑制 LPS 通过 TLR4 活化 NF-κB

由于人胚胎肾细胞(HEK293)容易转染,而且不表达 TLR 和吞噬受体,通常被用来做遗传互补实验(genetic complementary),探讨不同 TLR 受体之间,以及 TLR 与吞噬受体在活化抗原递呈细胞中的协同或抑制作用[4,5]。本实验采用此模型来探讨 SR-A 对 LPS 通过 TLR4 受体活化 NF-κB 的作用。

转染了 TLR4/MD-2 和 NF-κB-SEAP 报告基因的 HEK293 细胞在 LPS 刺激后能产生很高的 NF-κB 活性,而只转染了 TLR4/MD-2 的 HEK293 细胞只有本底的 NF-κB 活性,可能来源于未被完全灭活的内源性碱性磷酸酶,说明 TLR4 信号通路已成功在 HEK293 细胞中重建;共转染了 TLR4/MD-2 和 SR-A 的 HEK293,在接受 LPS 刺激后,NF-κB 活性明显被抑制,只有转染了 TLR4/MD-2 的 1/5,提示 SR-A 能抑制 LPS 活化 NF-κB;如果将突变的 TLR4(mTLR4)与 SR-A 同时转染 HEK293 细胞,就检测不到 NF-κB 活性,提示 NF-κB 活化的 TLR4 特异性(图 3)。

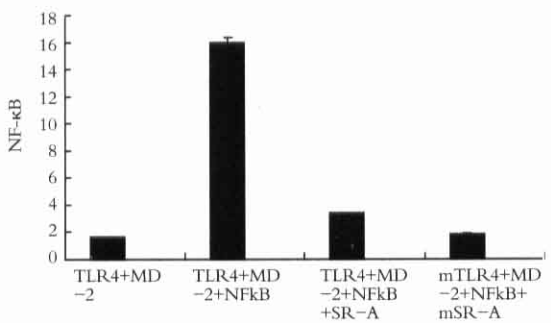


图 3　SR-A 抑制 LPS 通过 TLR4 活化 NF-κB

3 讨论

败血症和感染性休克主要缘于革兰阴性菌感染后释放的 LPS 诱导巨噬细胞和单核细胞产生大量的炎症因子(TNF-α、IL-1β 和 IL-6)和趋化因子。因此,研究巨噬细胞和单核细胞对 LPS 的分子调控机制,将可为败血症和感染性休克的预防和治疗提供新的方案和措施。

LPS 活化巨噬细胞和单核细胞,分泌炎症因子是由 TLR4(Toll-like receptor, TLR4)介导的[6]。感染诱导血清中应急蛋白 LPS 结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)上调,LBP 结合 LPS,并将 LPS 转移到 CD14,后者与 TLR4/MD-2 在细胞膜上形成 CD14/TLR4/MD-2 受体复合物,募集胞内的接头分子 MyD88、IRAK4 和 TRAF6,活化核因子 NF-κB,诱导炎症因子和趋化因子的分泌,在感染早期抑制病原体的扩散,而且还能诱导后续的适应性免疫。然而,过强的炎症反应将累及自身组织,甚至导致多器官功能衰减,引起败血症和休克,因此,机体势必存在相应的负性调控机制。如 Tollip 能与 TLR4 和 TLR2 结合,抑制 I-RAK 的活化[7]。

我们发现,LPS 能诱导巨噬细胞株 RAW264.7 表面 SR-A 上调,而 SR-A 上调的 RAW264.7 对 LPS 的再次刺激的反应性明显降低,表现为 TNF-α 和 IL-6 的分泌减少,而且与 LPS 诱导 RAW264.7 表达的 SR-A 水平密切相关。虽然巨噬细胞和单核细胞对 LPS 的再次刺激的反应性明显降低与 TLR4/MD-2 受体下调有关[8],但是不是 RAW264.7 对 LPS 的再次刺激的反应性明显降低的原因目前尚存在争论[9,10]。在我们的实验中 TLR4/MD-2 受体呈轻微上调。而遗传互补实验证实,转染了 SR-A 受体后,LPS 诱导产生的全明显受到抑制,提示 SR-A 受体上调是抑制 LPS 能诱导巨噬细胞的原因之一。

SR-A 具有广泛的配体结合活性,不但能结合乙酰化 LDL、马来酰牛血清白蛋白(maleylated bovine serum albumin, M-BSA)和热休克蛋白 gp96 [11],而且还能结合和内吞聚肌苷酸(polyinosinic acid)、多聚胞(嘧啶核)苷酸 (polycytidylic acid)、右旋糖酐、LPS、脂蛋白和褐藻多糖硫酸脂(fucoidan) 等多聚阴离子。实验证实,SR-A 不但能介导配体 Fucoidan 和乙酰化 LDL 等配体的内吞,而且具有信号转导能力[12,13],诱导巨噬细胞[14,15]分泌 IL-1β 和 TNF-α 等炎症因子。然而,LPS 与 SR-A 结合后并没有信号转导能力[1],因此,我们推测 SR-A 可能是通过结合和吞噬 LPS,减少活化 TLR4 信号通路的 LPS 量抑制炎症反应。遗憾的是我们目前还没有完成诱导上调的 SR-A 能增强 RAW264.7 结合和吞噬 LPS 的实验。

参考文献:

[1] HAMPTON R Y, GOLENBOCK D T, PENMAN M, *et al*. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors[J]. Nature, 1991, 352(6333): 342-344.

[2] HAWORTH R, PLATT N, KESHAV S, *et al*. The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock[J]. J Exp Med, 1997, 186(9): 1431-1439.

[3] SUZUKI H, KURIHARA Y, TAKEYA M, *et al*. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection[J]. Nature, 1997, 386(6622): 292-296.

[4] GANTNER B N, SIMMONS R M, CANAVERA S J, *et al*. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2[J]. J Exp Med, 2003, 197(9): 1107-1117.

[5] HOEBE K, GEORGEL P, RUTSCHMANN S, *et al*. CD36 is a sensor of diacylglycerides[J]. Nature, 2005, 433(7025): 523-527.

[6] CHOW J C, YOUNG D W, GOLENBOCK D T, *et al*. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction[J]. J Biol Chem, 1999, 274(16): 10689-10692.

[7] ZHANG G, GHOSH S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip[J]. J Biol Chem, 2002, 277(9): 7059-7065.

[8] NOMURA F, AKASHI S, SAKAO Y, *et al*. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression[J]. J Immunol, 2000, 164(7): 3476-3479.

[9] MATSUGUCHI T, MUSIKACHAROEN T, OGAWA T, *et al*. Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages[J]. J Immunol, 2000, 165(10): 5767-5772.

[10] YEO S J, YOON J G, HONG S C, *et al*. CpG DNA induces self and cross-hyporesponsiveness of RAW264.7 cells in response to CpG DNA and lipopolysaccharide: alterations in IL-1 receptor-associated kinase expression[J]. J Immunol, 2003, 170(2): 1052-1061.

[11] BERWIN B, HART J P, RICE S, *et al*. Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells[J]. EMBO J, 2003, 22(22): 6127-6136.

[12] COLLER S P, PAULNOCK D M. Signaling pathways initiated in macrophages after engagement of type A scavenger receptors[J]. J Leukoc Biol, 2001, 70(1): 142-148.

[13] JOZEFOWSKI S, KOBZIK L. Scavenger receptor A mediates H2O2 production and suppression of IL-12 release in murine macrophages[J]. J Leukoc Biol, 2004, 76(5): 1066-1074.

[14] HSU H Y, HAJJAR D P, KHAN K M, *et al*. Ligand binding to macrophage scavenger receptor-A induces urokinase-type plasminogen activator expression by a protein kinase-dependent signaling pathway[J]. J Biol Chem, 1998, 273(2): 1240-1246.

[15] HSU H Y, CHIU S L, WEN M H, *et al*. Ligands of macrophage scavenger receptor induce cytokine expression *via* differential modulation of protein kinase signaling pathways[J]. J Biol Chem, 2001, 276(31): 28719-28730.

(编辑 王 红)