文章编号:1000-5404(2006)19-1945-04

论著

八肽胆囊收缩素对脂多糖诱导ECV-304一氧化氮合酶表达的分子抑制作用

高 峰,谷振勇,平 静,刘 霞,赵 丽,徐锦荣,倪志宇,丛 斌,凌亦凌 (河北医科大学法医系,石家庄 050017)

提 要:目的 探讨CCK-8抑制LPS诱导ECV-304 iNOS表达的分子机制。**方法** 培养ECV-304,用溶剂、CCK-8、LPS及CCK受体拮抗剂丙谷胺分别或联合孵育细胞,用Western blot检测iNOS蛋白表达,用免疫细胞化学方法检测NF-κB P65蛋白表达与核移位,用RT-PCR检测CCK-AR和CCK-BR mRNA表达。**结果** ①溶剂对照组ECV-304 iNOS蛋白呈低表达;LPS诱导iNOS表达明显上调,CCK-8剂量依赖性抑制LPS的作用,单独CCK-8对其无影响。②ECV-304存在CCK-AR和CCK-BR mRNA表达,其中CCK-BR mRNA表达稍强。LPS可诱导CCK-AR和CCK-BR mRNA表达明显增强。③溶剂对照组NF-κB P65蛋白主要分布于细胞质;LPS孵育1 h后细胞核中NF-κB P65表达明显增加,CCK-8剂量依赖性抑制LPS的作用;单独CCK-8对其无影响。④丙谷胺可翻转CCK-8的抑制作用。**结论** ECV-304存在CCK-AR和CCK-BR mRNA表达;CCK受体和NF-κB参与介导CCK-8抑制LPS诱导ECV-304 iNOS蛋白表达上调。

关键词:缩胆囊素;脂多糖类;诱生型一氧化氮合酶;核转录因子-κB;CCK受体
中图法分类号:R345;R394.6;R977.6 **文献标识码**:A

Inhibitive effect of cholecystokinin octapeptide on iNOS expression induced by lipopolysaccharide in ECV-304

GAO Feng, GU Zhen-yong, PING Jing, LIU Xia, ZHAO Li, XU Jin-rong, NI Zhi-yu, CONG Bin, LING Yi-ling
(Department of Forensic Medicine, Heibei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: Objective To elucidate the molecular mechanism of cholecystokinin octapeptide (CCK-8) inhibiting of iNOS expression in ECV-304 induced by LPS. **Methods** ECV-304 cells, were stimulated with LPS in the presence or absence of CCK-8 (10^{-9} – 10^{-7} mol/L) or/and CCK receptor antagonist proglumide. The iNOS protein level in the cytoplasm at 16 h after stimulation was detected with Western blotting. The expressions of CCK-AR and CCK-BR mRNA were assayed with RT-PCR. The level of NF-κB P65 protein was detected in cytoplasm and nuclus at 1 h after stimulation with immunocytochemical technique. **Results** LPS led to the up-regulation of iNOS protein expression in ECV-304 that was obviously inhibited by CCK-8 in a dose-dependent manner. CCK-8 alone did not affect iNOS protein expression. CCK-AR mRNA expression was higher than CCK-BR mRNA expression in ECV-304. The expression of CCK-AR and CCK-BR mRNA could be up-regulated obviously by LPS. LPS increased NF-κB P65 protein expression in the nuclus of ECV-304. CCK-8 obviously inhibited LPS-induced changes of NF-κB P65 protein in a dose-dependent manner. The inhibitive effects of CCK-8 on iNOS protein expression and NF-κB P65 were attenuated by proglumide. **Conclusion** There were CCK-AR and CCK-BR mRNA expressions in ECV-304. CCK-8 inhibited LPS-induced up-regulation of iNOS protein expression by acting CCK receptors and NF-κB in ECV-304.

Key words: cholecystokinin octapeptide; lipopolysaccharide; inducible nitric oxide synthase; NF-κB; cholecystokinin receptor

基金项目:教育部科学技术研究资助重点项目(204016);河北省自然科学基金资助项目(301351)
Supported by the Key Program of Sci & Tech Research of Ministry of Education (204016) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (301351)
作者简介:高 峰(1976-),男,河北省正定县人,博士,主要从事血管生物学及法医病理学方面的研究,现在河北省公安厅法医科。E-mail: gaofeng761226@163.com
通讯作者:谷振勇,电话:(0311)86266325,E-mail: zhenyong88@sohu.com
收稿日期:2005-07-26;**修回日期**:2006-01-16

血管调节机制紊乱是内毒素休克的特征性病理改变。血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VEC)损伤是内毒素休克时血管调节机制紊乱的关键因素。八肽胆囊收缩素(cholecystokinin octapeptide, CCK-8)是一种神经内分泌调节肽,参与调节中枢神经系统、内分泌系统和消化系统的多种功能,对心血管功能也有调节作用[1,2]。本室以往的研究显示,CCK-8 具有明显的抗内毒素休克作用[3],可抑制内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)引起的 VEC 生成 NO 增多、减轻 VEC 损伤[4],CCK-8 的保护效应为 CCK 受体非特异性拮抗剂丙谷胺(proglumide, Pro)部分翻转,提示 VEC 可能存在 CCK 受体;CCK-8 调节 LPS 诱导 VEC NO 生成的作用机制,迄今尚不清楚。业已公认,VEC 存在诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS),iNOS 是病理情况下 NO 大量生成的主要酶。转录因子 κB(nuclear transcription factor-κB, NF-κB)是调控 iNOS 基因表达的关键因素。本实验以人脐静脉内皮细胞系 ECV-304 为研究对象,观察 LPS 诱导 VEC CCK 受体及 NF-κB 核移位及 CCK-8 影响,以探讨 CCK-8 调节 LPS 诱导 VEC NO 生成的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

ECV-304 细胞株购自中国典型培养物保藏中心(CCTCC,武汉);脂多糖(*E. coli*. lipopolysaccharide, LPS),八肽胆囊收缩素(CCK-8),丙谷胺(Proglumide, Pro),胰蛋白酶均为 Sigma 公司产品,兔抗人 NF-κB p65 多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品,兔抗人 iNOS 多克隆抗体购自北京中山生物工程公司,CCKA 受体(CCK-AR)和 CCKB 受体(CCK-BR)引物由北京奥科生物公司合成,余试剂为国产分析纯。

1.2 细胞培养

细胞株 ECV-304,用含 10% 胎牛血清,10^5 U/L 青霉素及 100 mg/L 链霉素的 R-1640 培养液于 37 ℃、5% CO_2 及 95% O_2 条件下培养,0.25% 胰蛋白酶进行消化传代。

1.3 Western blotting 检测细胞浆 iNOS 蛋白表达

待细胞长到每瓶 1×10^6 时,换用不含血清的 R-1640 培养液继续培养细胞,用溶剂、CCK-8(10^{-8} mol/L)、LPS(1 mg/L)、CCK-8(10^{-9} ~ 10^{-7} mol/L) + LPS 和 Pro(2 mg/L) + CCK-8(10^{-8} mol/L) + LPS(1 mg/L)分别刺激 ECV-304 16 h。

用细胞质裂解缓冲液(100 mmol/L HEPES,1% Triton X-100, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF)裂解 ECV-304,冰浴 15 min,20 000 × *g* 低温离心 15 min,上清即为细胞浆蛋白,用考马斯亮蓝 G250 试剂盒测定蛋白浓度。取 100 μg 胞浆蛋白,经 SDS-10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,将凝胶上的蛋白质转移至硝酸纤维素膜。2% 脱脂奶粉封闭膜,37 ℃缓摇 1 h,TBS 略为漂洗,加入兔抗人 iNOS 多克隆抗体(1∶100稀释),4 ℃孵育过夜。TBS 振荡漂洗,10 min × 3 次,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG,37 ℃孵育 1 h,TBS 漂洗后,DAB 显色,用 Gel-Pro 凝胶分析软件对显色条带进行半定量分析,取其面积与荧光强度的乘积代表蛋白 iNOS 表达的相对水平。

1.4 半定量 RT-PCR 检测 CCK 受体 mRNA 表达

待细胞长到每瓶 1×10^6 时,用溶剂或 LPS(1 mg/L)孵育 ECV-304,LPS 分别孵育 0.5、2、6 h。用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取细胞总 RNA,取总 RNA 20 μg 经 1% 琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳鉴定。取总 RNA 4 μg,在 AMV 逆转录酶作用下,用随机引物合成 cDNA。在含有 2 mmol/L $MgCl_2$、4 U *Taq* DNA 聚合酶及 25 pmol CCK 受体特异性引物的 25 μl 反应体系中,进行 cDNA 的聚合酶链式反应,以 β-actin 为内参对照(480 bp)。CCK-AR 引物为:上游引物 5′-CATGCTCATCGTCATCGTGCT-3′,下游引物 5′-GGCTGTACGAGAACCTGGACA -3′(320 bp),CCK-BR 特异性引物为:上游引物 5′-GTTGCTGGTG ATCGTTGTGC-3′,下游引物 5′-CCAGTGTGCTGATGGTGGT GT-3′ (332 bp)。循环参数为:变性 95 ℃ 30 s;复性 59 ℃ 1 min(CCK-AR),58 ℃ 1 min(CCK-BR);延伸 72 ℃ 1 min;循环 28 次后进一步延伸 72 ℃ 7 min。合成的 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离,用 Gel-Pro 凝胶分析软件对电泳谱带进行半定量分析,用任意单位(AU)表示凝胶谱带的面积 × 荧光强度值,CCK 受体/β-actin 的 AU 比值代表 CCK 受体 RNA 相对表达水平。

1.5 免疫细胞化学方法检测细胞核 NF-κB p65 蛋白表达

待细胞长到每瓶 1×10^6 时,换用不含血清的 R-1640 培养液培养细胞,用溶剂、CCK-8(10^{-8} mol/L)、LPS(1 mg/L)、CCK-8(10^{-9} ~ 10^{-7} mol/L) + LPS 和 Pro(2 mg/L) + CCK-8(10^{-8} mol/L) + LPS(1 mg/L)分别刺激 ECV-304 1 h。

将细胞悬液移入已置入玻片的培养皿中,加入含 10% 胎牛血清的 R-1640,培养 24 h,然后换用不含胎牛血清 R-1640,同时加入不同因素刺激 1 h 后,将贴有细胞的玻片夹出,用 0.01 mol/L PBS 洗 2 次,各 5 min,然后用 95% 乙醇固定 30 min,PBS 洗 3 次各 3 min,3% H_2O_2 作用 10 min,0.3% Triton X-100 作用 10 min,10% 山羊血清封闭 15 min,加入兔抗人 NF-κB p65 多克隆抗体(1∶100稀释),4 ℃孵育过夜,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG,DAB 显色,二甲苯封片,细胞核着棕黄色为有阳性结果,用 Gel-Pro 凝胶分析软件进行半定量分析。

1.6 统计学处理

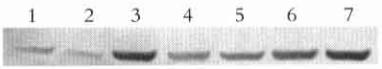
数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 统计软件处理数据,组间差异采用单因素方差分析,有显著性差异者用最小显著差法(least significant difference, LSD)进行两两比较。

2 结果

2.1 CCK-8 抑制 LPS 诱导 ECV-304 iNOS 蛋白的表达

溶剂对照组 ECV-304 有 iNOS 蛋白少量表达;1 mg/L LPS 孵育 16 h 后,iNOS 蛋白表达明显上调,与对照组相比有明显差异($P<0.01$);10^{-9} ~ 10^{-7} mol/L CCK-8 与 LPS 共同孵育,iNOS 蛋白表达显著下降,与 LPS 组相比差异显著($P<0.05$),其中

CCK-8 浓度越大 iNOS 蛋白表达下降越明显；Pro、CCK-8 与 LPS 共同作用，iNOS 蛋白表达明显升高，与 CCK-8 + LPS 组相比有明显差异（$P<0.01$）；CCK-8 单独孵育对 iNOS 蛋白表达无明显影响。见图 1。

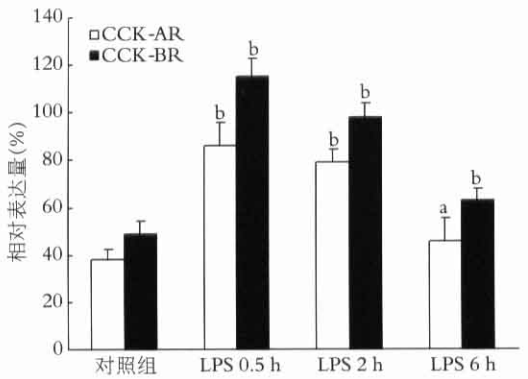


1：溶剂对照组；2：CCK-8（10^{-8} mmol/L）组；3：LPS 组；4－6：CCK-8（10^{-7}～10^{-9} mol/L）+ LPS 组；7：Pro + CCK-8（10^{-8} mol/L）+ LPS 组

图 1　CCK-8 抑制 LPS 诱导 ECV-304 iNOS 蛋白表达（$n=3$）

2.2　ECV-304 存在 CCK-AR 和 CCK-BR mRNA 表达及 LPS 的影响

CCK-AR 和 CCK-BR mRNA 在正常 ECV-304 上均有表达，CCK-AR mRNA 扩增片段为 320 bp，CCK-BR mRNA 扩增片段为 332 bp，CCK-BR mRNA 表达量略高于 CCK-AR mRNA 表达量。在 LPS 诱导作用下，CCK-AR 和 CCK-BR mRNA 表达均明显升高，其中 0.5 h mRNA 表达至高峰，分别是对照组的 2.32 倍和 2.37 倍（$P<0.01$），2、6 h 表达量呈下降趋势，但仍明显高于对照组（$P<0.05$）（图 2）。

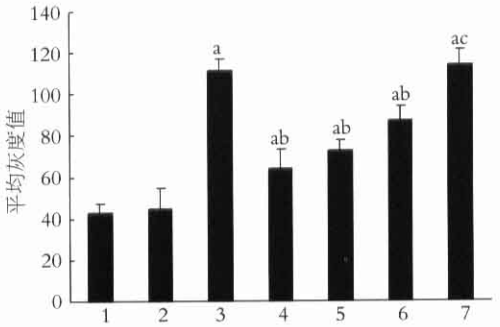


a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

图 2　RT-PCR 方法检测 LPS 对 ECV-304 CCK-AR 和 CCK-BR mRNA 相对表达量的影响（$n=3$）

2.3　CCK-8 抑制 LPS 诱导 ECV-304 NF-κB 蛋白核移位

溶剂对照组中 ECV-304 有 NF-κB P65 蛋白少量表达，主要分布于 ECV-304 细胞质，细胞核中较少；1 mg/L LPS 孵育 1 h 后 NF-κB P65 蛋白明显核移位、细胞核中表达增加，与对照组相比差异显著（$P<0.01$）；CCK-8 与 LPS 共同作用，细胞核中 NF-κB P65 蛋白表达量较 LPS 组显著下降（$P<0.01$），且 CCK-8 浓度越大下降越明显。Pro、CCK-8 与 LPS 共同作用，NF-κB P65 蛋白仍出现明显核移位，与 CCK-8 + LPS 组相比明显升高（$P<0.05$）；CCK-8 单独作用对 NF-κB P65 蛋白核移位无明显影响（$P>0.05$），见图 3。



1：对照组；2：CCK-8（10^{-8} mmol/L）；3：LPS；4－6：CCK-8（10^{-7}～10^{-9} mol/L）+ LPS；7：Pro + CCK（10^{-8} mol/L）+ LPS

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 LPS 组比较；c：$P<0.01$，与 CCK-8（10^{-8} mol/L）+ LPS 组比较

图 3　CCK-8 抑制 LPS 诱导 ECV-304 NF-κB 蛋白表达（$n=3$）

3　讨论

本实验采用的 ECV-304 细胞株是膀胱癌细胞与人脐静脉内皮细胞融合建立的永生细胞系，最初是 1990 年日本东京医学研究中心提出，后经美国多家实验室验证。新近学者提出 ECV-304 和人脐静脉内皮的生物学性状存在一些差异，但研究表明，ECV-304 在药理和病理生理学方面仍具有血管内皮细胞模型研究价值[4]。本实验以 ECV-304 为研究对象，观察 CCK-8 对 LPS 诱导 VEC iNOS 表达抑制性调节作用的分子机制。本实验结果显示，CCK-8 剂量依赖性抑制 LPS 诱导 ECV-304 iNOS 蛋白表达上调，提示下调 iNOS 蛋白表达可能是 CCK-8 抑制 NO 生成增多的途径之一。鉴于促炎细胞因子诱导 VEC iNOS 表达上调、NO 及其衍生物大量生成是导致 VEC 损伤的重要途径，推测 CCK-8 可抑制性调节 LPS 诱导 ECV-304 iNOS 蛋白表达上调，可能是 CCK-8 发挥抗休克作用，缓解内毒素休克过程中血管调节机制紊乱的机制之一。

CCK 受体属 G 蛋白偶联受体，存在 7 个跨膜域。根据 CCK 不同的生理、药理作用和特异性拮抗剂亲和力，将 CCK 受体分为 CCK-AR 和 CCK-BR 两型[5]，在脑、胃肠道、肺脏、心肌组织和脾细胞均有分布。Cong 等[6]用原位 PCR 技术发现，在大鼠肺脏间质小血管内皮细胞表达 CCK-AR、CCK-BR；新近发现大鼠肺动脉平滑肌细胞也存在 CCK-BR mRNA 表达（待发表）。Pro 可部分翻转 CCK-8 对 LPS 引起血管内皮依赖性舒张反应降低的抑制效应，提示 VEC 可能存在 CCK 受体。本实验结果显示，在人 ECV-304 存在 CCK-AR 和 CCK-BR mRNA 表达，其中 CCK-BR mRNA 表达量略

高于 CCK-AR mRNA；LPS 诱导 ECV-304 CCK-AR、CCK-BR mRNA 表达明显上调。实验还显示，Pro 可翻转 CCK-8 对 LPS 诱导 ECV-304 iNOS 蛋白表达上调的抑制作用，表明提示 CCK-8 抑制 LPS 诱导 ECV-304 iNOS 蛋白表达上调可能是由 CCK 受体介导的。

NF-κB 是 1986 年由 Sen 首先报道的一种具有多向性调节作用的转录因子，广泛参与炎症细胞因子的转录调节。NF-κB 主要由 P50 和 P65 2 个亚基形成的异源二聚体，在静息细胞内，P65 亚基与抑制性亚基 I-κB结合，形成无活性的 NF-κB－I-κB 复合体，分布于细胞质中。当细胞受到 LPS 等促炎症因子刺激后，NF-κB 与 I-κB 解离，移位于细胞核与 DNA 特异序列结合参与免疫和炎症相关基因的转录调控。本室以往研究结果显示，CCK-8 抑制内毒素血症大鼠肺组织或者 LPS 处理的肺间质巨噬细胞 NF-κB 活性增高，减轻肺组织的病理变化，抑制巨噬细胞促炎细胞因子的表达[7,8]。CCK-8 抑制 LPS 诱导 ECV-304 iNOS 蛋白表达上调过程中，CCK-8 是否也是通过 NF-κB 信号转导通路而发挥作用呢？本实验结果显示，对照组 NF-κB p65 蛋白主要分布于 ECV-304 细胞质，细胞核中有少量表达；LPS 孵育 1 h 后 NF-κB P65 蛋白明显核移位、细胞核中表达明显增加；CCK-8 单独作用对 NF-κB P65 蛋白核移位无明显影响，而与 LPS 合用时，CCK-8 可剂量依赖性抑制 LPS 诱导 NF-κB P65 蛋白核移位；Pro 可翻转 CCK-8 对 LPS 诱导 NF-κB P65 蛋白核移位的抑制作用。表明 CCK-8 可抑制 LPS 诱导的 NF-κB 表达及核移位，该作用由 CCK 受体介导；鉴于 iNOS 基因增强子存在 NF-κB 结合位点，NF-κB 对 iNOS 基因表达起关键性调节作用[9]。可以推测 CCK-8 抑制 LPS 诱导 ECV-304 iNOS 表达上调，可能是通过调节 NF-κB 表达来实现的，该作用可能由 CCK 受体介导。而介导 CCK-8 抑制作用的 CCK 受体具体类型有待进一步研究。

参考文献：

[1] WISNIEWSKA R J, WISNIEWSKI K. Involvement of nitric oxide in cardiovascular effects of cholecystokinin (CCK) in rats[J]. Rocz Akad Med Bialymst, 1998, 43: 169－185.

[2] 赵晓云，凌亦凌，孟爱宏，等. 八肽胆囊收缩素对大鼠心功能的影响及受体机制[J]. 生理学报，2002，54(3)：239－243.

[3] 凌亦凌，黄善生，王乐丰，等. 八肽胆囊收缩素抗内毒素休克的实验研究[J]. 生理学报，1996，48(4)：390－394.

[4] 吴其夏，邱 劲. ECV304 细胞可作为一般模型、工具或靶用于生物医学和药学研究[J]. 中国病理生理杂志，2004，20(1)：139－142.

[5] NOBLE F, WANK S A, CRAWLEY J N, *et al*. International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors[J]. Pharmacol Rev, 1999, 51(4): 745－781.

[6] CONG B, LI S J, LING Y L, *et al*. Expression and cell-specific localization of cholecystokinin receptors in rat lung[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(6): 1273－1277.

[7] 丛 斌，凌亦凌，谷振勇，等. 八肽胆囊收缩素对脂多糖诱导大鼠肺组织 NF-κB 活性增高的抑制作用[J]. 中国病理生理杂志，2002，18(6)：615－618.

[8] 李淑瑾，姚玉霞，朱桂军，等. CCK-8 抑制 LPS 诱导大鼠肺间质巨噬细胞 TNF-α 转录及 NF-κB 活性[J]. 中国病理生理杂志，2004，20(8)：1335－1339.

[9] 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.

（编辑 龙 亮）

《世界科学技术——中医药现代化》2007 年征订启事

《世界科学技术——中医药现代化》是一本反映我国中医药现代化理论和实践的最新科学研究成果，探索多学科理论和技术在中医药领域的现代应用，为本领域前沿科学工作者提供学术研讨平台，为相关企业提供新技术资源的专业性学术期刊，2005 年获得科技部中国科技核心期刊认证，同时被中国科技论文统计源期刊、《中文科技期刊数据库》、CAJ-CD、CNKI、CMCC 等收录。

主要内容：前沿科学发展和交叉学科探索，国家中药现代化国际化科技目标、战略和政策，最新的技术成果和进展，国际规范与世界科技动向，新思想新方法，中国传统药物研究现状、成果、优势和发展趋势等。

杂志以营造创新氛围，孕育优秀科学家和杰出科学成熟为根本任务，注重中医药学科与其他自然科学学科在研究思路方面的衔接与结合，是汇聚新兴交叉学科和创新思路的理想讲台。本刊为双月刊，ISSN1003－1898 CN11－1733/N，邮发代号：2－534，每期定价 25 元，全年定价 150 元。

地 址：北京市海淀区中关村东路 55 号中科院基础园思源楼 5 层 邮 编：100080

电 话：(010)62616352，62652762 E-mail：wst@casipm.ac.cn 网 址：www.wst.ac.cn