论著

文章编号:1000-5404(2011)10-1032-04

CaM抑制剂对LPS/IFN-γ诱导的RAW264.7细胞NO生成及iNOS表达的影响

袁小媚[1],雷 寒[1],柳 青[2],夏 勇[3],马康华[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:心血管内科[1],临床研究中心[2];The Ohio State University,Columbus,OH,43210,USA[3])

【摘要】 **目的** 观察钙调蛋白(Calmodulin,CaM)抑制剂对脂多糖/干扰素γ(LPS/IFN-γ)诱导的RAW264.7细胞一氧化氮(NO)的生成及诱生型一氧化氮合酶(iNOS)表达的作用及其可能的作用机制。**方法** 采用LPS/IFN-γ诱导RAW264.7巨噬细胞建立细胞炎症反应模型,钙调蛋白抑制剂(W-7,TFP)预处理细胞后,采用Griess试剂法测定NO释放量;采用Western blot法测定目的蛋白的表达;采用反转录聚合酶链反应法(RT-PCR)分析iNOS mRNA表达的变化。**结果** CaM抑制剂可抑制LPS/IFN-γ诱导的RAW264.7细胞NO的释放($P<0.01$);可抑制iNOS蛋白和mRNA的表达,早期可抑制IκBα的降解、磷酸化IKK(PIKK)和$STAT_1$的蛋白($PSTAT_1$)表达。**结论** CaM抑制剂可明显降低LPS诱导的RAW264.7细胞NO、iNOS蛋白和mRNA表达;可以通过抑制IκBα降解和磷酸化IKK蛋白表达而发挥抗炎作用。

【关键词】 钙调蛋白抑制剂;诱生型一氧化氮合酶;脂多糖;干扰素γ

【中图法分类号】 R392.12;R394-33;R394.2 【文献标志码】 A

Effect of calmodulin inhibitor on NO production and iNOS expression induced by LPS/IFN-γ in RAW264.7 cells

Yuan Xiaomei[1], Lei Han[1], Liu Qing[2], Xia Yong[3], Ma Kanghua[1] ([1]Department of Cardiology, [2]Clinical Research Center, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]The Ohio State University, Columbus, OH, 43210, USA.)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of calmodulin (CaM) inhibitor on nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression induced by lipopolysaccharide (LPS) and/or interferon-γ (IFN-γ) in mouse RAW264.7 macrophage cells, and to study the anti-inflammation mechanism of CaM inhibitor. **Methods** An inflammatory response model was established using RAW264.7 cells induced by LPS and/or IFN-γ. CaM inhibitors N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7) and trifluoperazine (TFP) were used to pre-treat RAW264.7 cells to evaluate the effects of the CaM inhibitors. NO concentration was measured with Griess Reagent Kit. Target protein and mRNA expression was tested by Western blot and RT-PCR. **Results** In RAW264.7 cells induced by LPS or IFN-γ, CaM inhibitors W-7 and TFP significantly blocked NO production ($P<0.01$) and protein and mRNA expression of iNOS ($P<0.01$). In RAW264.7 cells induced by LPS and IFN-γ, W-7 and TFP remarkably prevented IκBα degradation ($P<0.01$) and phospho-IKK and phospho-STAT1 protein expression ($P<0.01$). **Conclusion** CaM inhibitors W-7 and TFP can inhibit LPS/IFN-γ-induced NO production and iNOS protein and mRNA expression in RAW264.7 cells, probably by the mechanism of suppressing IκBα degradation and phospho-IKK and phospho-STAT1 protein expression. The anti-inflammatory effects of CaM inhibitors may be associated with NF-κB and JAK-STAT1 signaling pathways.

【**Key words**】 calmodulin inhibitor; NO; iNOS; LPS; IFN-γ

Corresponding author: Lei Han, E-mail: hanleicq@hotmail.com

【通信作者】 雷 寒,E-mail:hanleicq@hotmail.com

钙调蛋白(Calmodulin, CaM)是迄今发现的细胞内最重的钙受体蛋白,是钙离子在细胞中重要的分子受体,与钙离子有高度的亲和力。钙调蛋白和钙离子结合后活化,激活钙调蛋白激酶[Calmodulin kinase (CaMK)Ⅱ]等一系列酶,参与细胞收缩、胞饮、胞吐等生理功能。(N-6-aminohexyl)-5-chloro-lnafthalene-sulfonamide(W-7)和TFP(trifluoperazine)是钙调蛋白常见的两种抑制剂,一氧化氮合成酶(NOS)是NO合成所必须的酶类。NOS分为诱生型一氧化氮合酶(iNOS)、神经型一氧化氮合酶(nNOS)和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)3种类型。在活化的巨噬细胞中,iNOS水平对NO的产生起到关键的作用。调节NO生成或iNOS表达可能是治疗炎症反应的重要靶点。巨噬细胞在外部细菌毒素如脂多糖(LPS)、干扰素(IFN-γ)等刺激下,可促使炎症介质如NO等的分泌,并被广泛应用于研究炎症反应[1]。iNOS对NO的生成起着关键性调节性作用。本实验拟通过LPS/IFN-γ诱导RAW 264.7小鼠巨噬细胞建立炎症反应模型,探讨CaM抑制剂的抗炎作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及处理

RAW 264.7小鼠巨噬细胞由美国俄亥俄州立大学医学中心提供,37 ℃孵箱中培养。用W-7(终浓度100 μmol/L)和TFP(终浓度80 μmol/L)预处理细胞15 min后,加入LPS(终浓度2 mg/ml,加入等量的DMSO作为空白对照)和/或IFN-γ(终浓度100 U/ml,加入等量的DMSO作为空白对照)诱导RAW 264.7细胞。分别于0、2、4、6、8 h收集细胞测定NO浓度、iNOS蛋白和mRNA变化;分别于0、5、10、20、30 min收集细胞观察目的蛋白表达。

1.2 主要试剂

LPS、IFN-γ及Trizol提取试剂盒购于Sigma公司,iNOS购于BD公司,DMEM培养基购于Invitrogen公司,胎牛血清购于GIBCO公司,Griess Reagent试剂盒与反转录聚合酶链反应试剂盒购于Invitrogen公司,蛋白浓度测量试剂购于Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 NO测定 96孔板中混合如下试剂:20 μl格里斯试剂,150 μl细胞培养液(对照组和给药组),130 μl去离子水,室温下放置30 min。20 μl格里斯试剂加280 μl去离子水作为空白对照。分光光度仪测量各组吸光度(波长548 nm)校正曲线。

1.3.2 Western blot测定 PBS收集细胞1 000~3 000 g室温下离心,根据沉淀大小加入细胞裂解液(RIPA 89%, PIC 10%, EDTA 1%),置冰上30 min。10 000×g 4 ℃离心15 min,上清液转至新管,测量蛋白浓度,根据浓度计算配样品,99 ℃ 5 min蛋白变性。电压150 V,电泳1 h,醋酸纸浸入转膜液15 min,15 V,35(1块胶)~45 min(2块胶)转膜。5%脱脂牛奶室温下孵育1 h,TBST洗3次,加入一抗4 ℃过夜。TBST洗3次,加入(1%脱脂牛奶稀释1:5 000)室温下孵育二抗1 h,TBST洗3次,室温下置显影液孵育5 min后暗室显影。

1.3.3 RT-PCR检测 按照Trizol抽提试剂说明书提取细胞总RNA。取8 μl做凝胶电泳,其余置-80 ℃保存备用。PCR反应体系条件:预变性94 ℃ 30 s,变性94 ℃ 30 s,退火60 ℃ 30 s,延伸72 ℃ 1 min 25个循环,最后延伸72 ℃ 7 min。结束后,产物经1%琼脂糖凝胶电泳(95 V,30 min)鉴定,用凝胶成像仪进行灰度扫描分析。

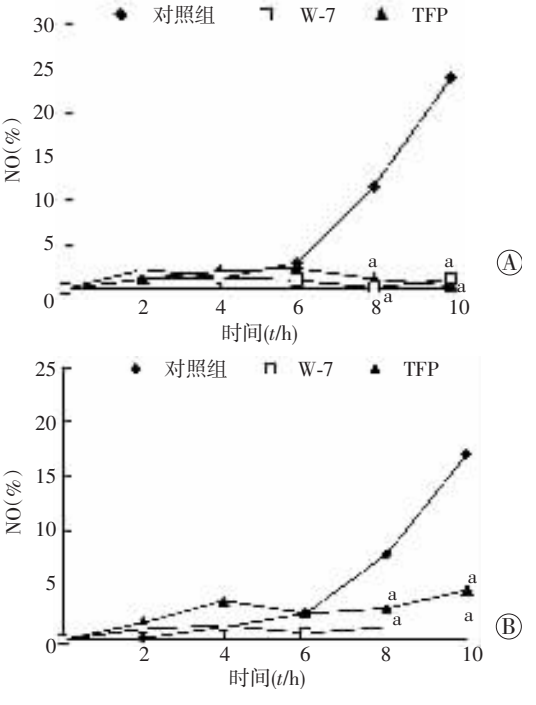
1.4 统计学处理

数据用$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件对数据进行配对资料t检验。

2 结果

2.1 不同时间细胞释放NO的变化

LPS诱导细胞0~6 h,对照组和给药组NO生成无明显变化;8 h开始,对照组NO产量明显升高,10 h达到高峰($P<0.01$),而W-7和TFP组无明显升高趋势(图1A)。IFN-γ诱导细胞0~6 h,对照组和给药组NO生成无明显变化;8 h开始,对照组NO产量升高,10 h达到高峰($P<0.01$),而W-7和TFP组无明显升高趋势(图1B)。



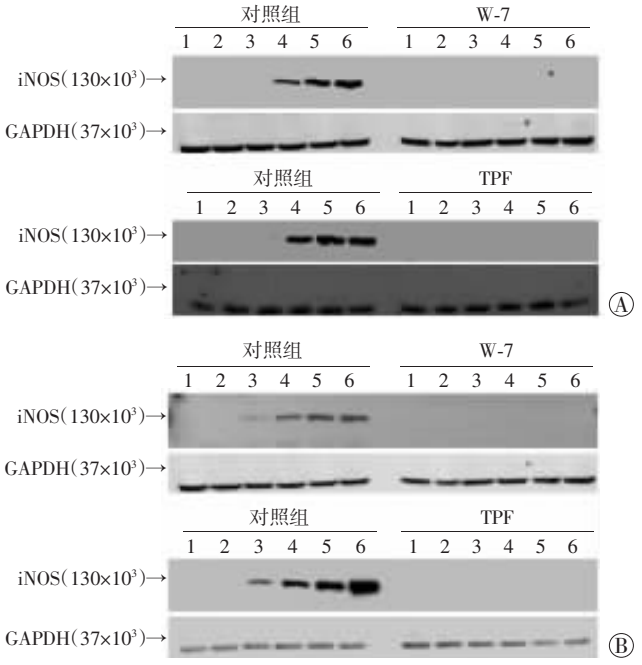
A:LPS诱导;B:IFN-γ诱导 a:$P<0.01$,与对照组比较

图1 Greiss法测定W-7和TFP抑制RAW264.7细胞NO的生成

2.2 RAW264.7细胞iNOS蛋白含量的变化

LPS诱导细胞6 h开始有iNOS蛋白表达(图2A),IFN-γ诱导细胞4 h开始有iNOS蛋白表达(图2B),10 h仍有强表达,

而W-7和TFP组与对照组比较无明显表达，差异有统计学意义（$P<0.01$）。

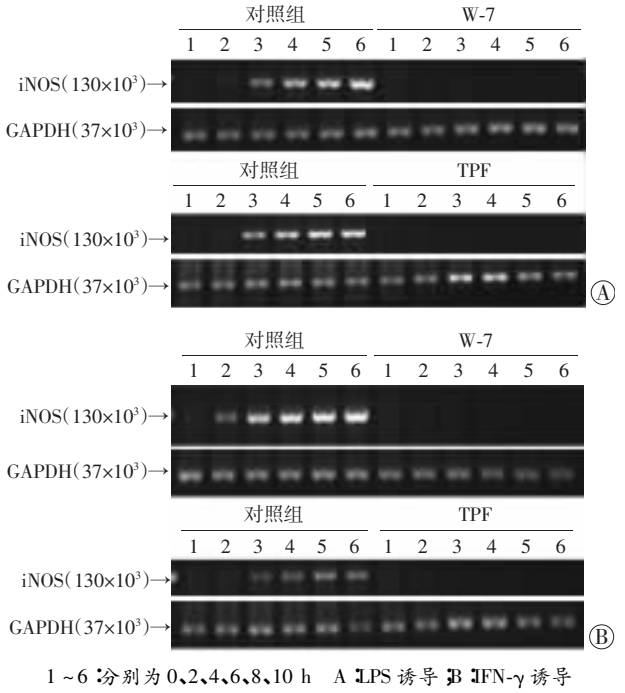


1～6：分别为0、2、4、6、8、10 h　A：LPS诱导；B：IFN-γ诱导

图2　Western blot法测定W-7和TFP抑制RAW264.7细胞iNOS蛋白的表达

2.3　不同时间细胞iNOS mRNA表达的变化

LPS诱导细胞4 h开始有iNOS mRNA表达（图3A），IFN-γ诱导细胞2 h开始有iNOS mRNA表达（图3B），10 h仍有强表达，而W-7和TFP组与对照组比较无明显表达，差异有统计学意义（$P<0.01$）。

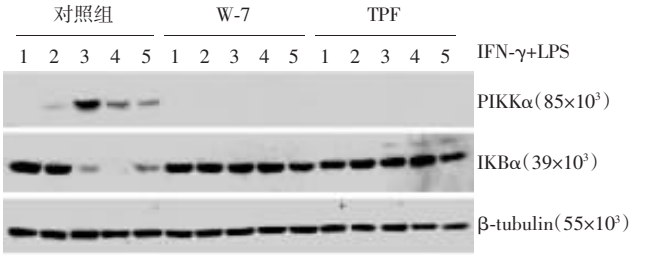


1～6：分别为0、2、4、6、8、10 h　A：LPS诱导；B：IFN-γ诱导

图3　RT-PCR法测定W-7和TFP抑制RAW264.7细胞iNOS mRNA的表达结果

2.4　早期细胞IκBα、PIKK蛋白表达的变化

LPS/IFN-γ诱导细胞5 min时对照组出现PIKK弱表达，10 min时PIKK蛋白表达增强，IκBα蛋白表达微弱；而W-7和TFP组PIKK蛋白未见表达，IκBα蛋白表达保持增强的水平，差异有统计学意义（$P<0.01$，图4）。

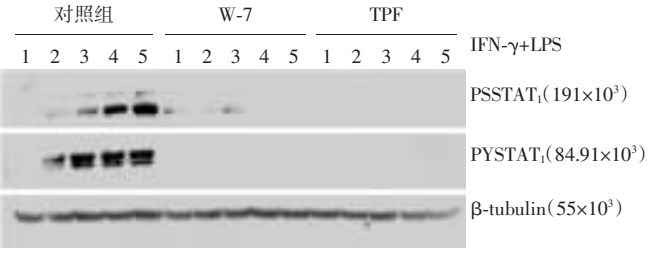


1～5：分别为0、5、10、20、30 min

图4　RAW264.7细胞IκBα和PIKK蛋白表达的变化

2.5　早期细胞$PSTAT_1$蛋白表达的变化

LPS/IFN-γ诱导细胞5 min时，对照组出现$PSSTAT_1$和$PYSTAT_1$蛋白表达；而W-7和TFP组未见蛋白明显表达，差异有统计学意义（$P<0.01$，图5）。



1～5：分别为0、5、10、20、30 min

图5　RAW26.4细胞磷酸化STAT1蛋白表达的变化

3　讨论

CaM是熟知的诱生型iNOS的辅助因素，它能促进分子内的电子转移和NO合成。临床常见的感染及微循环障碍，其死亡率始终居高不下，应引起我们的足够重视[1]。严重创伤、感染及各型休克晚期均存在血管低反应性[2]，严重影响治疗过程，是影响死亡率的重要因素。已知W-7和TFP是CaM的抑制剂，主要通过钙离子与钙调蛋白相结合，从而抑制钙调蛋白的激活。TFP作为CaM抑制剂可作为镇痛药物用于临床[3]。而有关CaM抑制剂用于炎症反应治疗的研究国内尚少见报道。因此，本实验选择以NO为靶点分子研究CaM抑制剂在炎症作用中的作用及其可能的分子机制。

NO的大量生成与炎症反应密切相关，NOS是NO合成所必需的酶类[4]。我们观察发现，钙调蛋白抑制剂W-7和TFP可呈现时间依赖性显著抑制LPS/IFN-γ

诱导的RAW264.7细胞NO的释放($P<0.01$)。近年来关于CaM与eNOS的研究较多[5-6]而CaM与iNOS的报道较少。iNOS在血管平滑肌细胞中受钙调蛋白的调节[7],钙调蛋白抑制剂可减少心血管NOS的生成[8]。本实验发现,钙调蛋白抑制剂W-7和TFP可呈现时间依赖性的显著下调LPS/IFN-γ诱导的RAW264.7细胞iNOS蛋白和mRNA的表达。

目前至少有3种主要LPS诱导iNOS的信号传导通路已明确。NF-κB信号通路是已知的LPS多种细胞通路的主要途径。目前研究发现,钙调蛋白抑制剂W-7和TFP影响IκBα和PIKK蛋白表达,而IκBα和PIKK是NF-κB信号通路重要的下游分子,由此推测钙调蛋白抑制剂W-7和TFP可能通过活化IKKα/β,随后磷酸化、泛素化、降解IκBα发挥作用。一些药物主要是通过IκBα和PIKK抑制LPS诱导iNOS的表达[9-11],因此,CaM抑制剂W-7和TFP抑制LPS/IFN-γ激活巨噬细胞炎症效应的机制可能部分通过下调LPS-NF-κB通路的激活来实现的。

研究报道[12-14],与IFN-γ密切相关的信号转导通路有多条,最主要的是JAK-$STAT_1$信号传导通路,其主要的下游蛋白是磷酸化的$STAT_1$(Ser^{727} $Stat_1$和Tyr^{701} $Stat_1$)。有研究报道CaM与NO的信号通路有关联[15]。本实验研究发现,LPS/IFN-γ诱导细胞5 min时,对照组开始出现$PSSTAT_1$(Ser^{727} $Stat_1$)和$PYSTAT_1$($Tyr^{701}Stat_1$)蛋白表达;而W-7和TFP组$PSSTAT_1$和$PYSTAT_1$蛋白无明显表达。从而推测钙调蛋白抑制剂W-7和TFP抑制LPS/IFN-γ诱导的RAW264.7细胞中iNOS表达的作用机制与JAK-$STAT_1$通路有关,这在国内外尚少见文献报道。因此,钙调蛋白抑制剂W-7和TFP抑制LPS/IFN-γ激活巨噬细胞的炎症效应的机制可能是部分通过IFN-γ-JAK-$STAT_1$信号通路实现的。

综上所述,本研究发现,钙调蛋白抑制剂W-7和TFP显著抑制LPS/IFN-γ诱导的RAW264.7细胞NO生成、iNOS蛋白及mRNA的表达;其作用机制可能是通过早期部分抑制RAW264.7细胞NF-κB和JAK-$STAT_1$信号传导通路来实现的。关于钙调蛋白抑制剂W-7和TFP更深入的分子生物学作用等有待进一步研究。

参考文献:

[1] Christaki E, Opal S M. Is the mortality rate for septic shock really decreasing?[J]. Curr Opin Crit Care, 2008, 14(5): 580-586.

[2] Fernandes D, Assreuy J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis [J]. Shock, 2009, 30(Suppl 1): 10-13.

[3] Tang L, Shukla P K, Wang Z J. Trifluoperazine, an orally available clinically used drug, disrupts opioid antinociceptive tolerance [J]. Neurosci Lett, 2006, 397(1/2): 1-4.

[4] Otani H. The role of nitric oxide in myocardial repair and remodeling [J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(8): 1913-1928.

[5] Caniffi C, Elesgaray R, Gironacci M, *et al*. C-type natriuretic peptide effects on cardiovascular nitric oxide system in spontaneously hypertensive rats [J]. Peptides, 2010, 31(7): 1309-1318.

[6] Yoon H J, Cho S W, Ahn B W, *et al*. Alterations in the activity and expression of endothelial NO synthase in aged human endothelial cells [J]. Mech Ageing Dev, 2010, 131(2): 119-123.

[7] Jones R J, Jourdheuil D, Salerno J C, *et al*. iNOS regulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ in vascular smooth muscle [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(6): H2634-H2642.

[8] Matsumoto M, Ohtsuki Y, Furihata M. Prognostic Significance of iNOS in Esophageal Cancer [J]. Cancer Drug Discovery and Development, 2010, (6), 329-340.

[9] Lin W W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer [J]. J Clin Invest, 2007, 117 (5): 1175-1183.

[10] Janeway C A Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition [J]. Annu Rev Immunol, 2002, 20: 197-216.

[11] Senftleben U, Karin M. The IKK/NF-kappaB pathway [J]. Crit Care Med, 2002, 30(1 Suppl): S18-S26.

[12] Park K, Scott A L. Cholesterol 25-hydroxylase production by dendritic cells and macrophages is regulated by type I interferons [J]. J Leukoc Biol, 2010, 8(6): 1081-1087.

[13] Park S R, Jung M H, Jeon S H, *et al*. IFN-gamma down-regulates TGF-beta1-induced IgA expression through Stat1 and p300 signaling [J]. Mol Cells, 2010, 29(1): 57-62.

[14] McGillicuddy F C, Chiquoine E H, Hinkle C C, *et al*. Interferon gamma attenuates insulin signaling, lipid storage, and differentiation in human adipocytes *via* activation of the JAK/STAT pathway [J]. J Biol Chem, 2009, 284(46): 31936-31944.

[15] Anand A, Saraf M K, Prabhakar S. Antiamnesic effect of B. monniera on L-NNA induced amnesia involves calmodulin [J]. Neurochem Res, 2010, 35(8): 1172-1181.

(收稿:2011-03-04 修回:2011-03-30)

(编辑 冷怀明)