论著

文章编号:1000-5404(2012)18-1814-04

ROCK1 在地塞米松抑制中性粒细胞释放和单核细胞黏附中的作用

刘 冬,熊仁平,陈星云,李 平,宁亚蕾,彭 艳,赵 艳,杨 楠,周元国 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所分子生物学中心,创伤烧伤及复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨 ROCK1 在地塞米松(dexamethasone,Dex)抑制中性粒细胞释放和单核细胞黏附中的作用。**方法** 检测地塞米松和法舒地尔(Fasudil,Fas)抑制佛波脂(PMA)诱导的中性粒细胞释放超氧化物阴离子(O_2^-)和髓过氧化物酶(myeloperoxidase ,MPO)以及 U937 单核细胞黏附的程度,并检测 ROCK1 和 RhoA 的表达和活性改变。此外观察糖皮质激素受体拮抗剂——米非司酮(mifepristone,M)和蛋白质合成抑制剂——放线菌酮(cycloheximide,C)对地塞米松这些作用的影响。实验分组:对照组、PMA 组、PMA + Dex 组、PMA + Dex + M 组、PMA + Dex + C 组和 PMA + Fas 组。**结果** 地塞米松可以显著抑制中性粒细胞释放 O_2^- 和 MPO[(1.25 ± 0.10) *vs* (1.95 ± 0.10);(1.07 ± 0.06) *vs* (1.75 ± 0.08),$P < 0.05$],而法舒地尔对其无明显抑制作用($P > 0.05$)。地塞米松和法舒地尔均可抑制 U937 细胞黏附[(0.09 ± 0.01) *vs* (0.08 ± 0.01) *vs* (0.28 ± 0.06), $P < 0.05$]。米非司酮和放线菌酮并不能影响地塞米松的这些作用($P > 0.05$)。**结论** 地塞米松以非 ROCK1 依赖方式抑制中性粒细胞释放;以 ROCK1 依赖方式通过非基因组效应抑制 U937 单核细胞的黏附。

[关键词] 地塞米松;非基因组效应;ROCK1
[中图法分类号] R392.12;R966;R977.11 [文献标志码] A

Role of ROCK1 in dexamethasone-inhibited neutrophil release and monocyte adhesion *in vitro*

Liu Dong, Xiong Renping, Chen Xingyun, Li Ping, Ning Yalei, Peng Yan, Zhao Yan, Yang Nan, Zhou Yuanguo (State Key Laboratory of Trauma, Burns, and Combined Injury, Molecular Biology Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of ROCK1 in the inhibitory effect of dexamethasone (Dex) on neutrophil release and monocyte adhesion. **Methods** The inhibitory effect of Dex and Fasudil (Fas) on the release superoxide anion (O_2^-) and myeloperoxidase (MPO) in neutrophil (PMN) after treatment of PMA, and the adhesion ability of U937 cells to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) after the stimulation as same as above mentioned was also determined. The expression and activity of ROCK1 and RhoA were also determined. Furthermore, the effect of glucocorticoid receptor antagonists (mifepristone, M) and protein synthesis inhibitors (cycloheximide, C) on dexamethasone were also evaluated. Cell samples were divided into control group, PMA group, PMA + Dex group, PMA + Dex + M group, PMA + Dex + C group and PMA + Fas group. **Results** Dex inhibited the release O_2^- and MPO of PMA-stimulated PMN (1.25 ± 0.10 *vs* 1.95 ± 0.10, 1.07 ± 0.06 *vs* 1.75 ± 0.08, $P < 0.05$), but Fasudil had no this function ($P > 0.05$). Dexamethasone and Fasudil inhibited adhesion ability of U937 cells significantly (0.09 ± 0.01 and 0.08 ± 0.01 *vs* 0.28 ± 0.06, $P < 0.05$). Mifepristone and cycloheximide did not interfere with the effect of Dex. **Conclusion** Dex inhibits the release of neutrophil *via* non-ROCK1 dependent pathway, and discourages U937 monocyte adhesion in ROCK1 dependent pathway *via* non-genomic effects.

[**Key words**] dexamethasone; non-genomic effects; ROCK1

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470988) and the Project of Innovation Team of Ministry of Education (IRT0712). Corresponding author: Zhou Yuanguo, Tel:86-23-68757471, E-mail:ygzhou@cta.cq.cn

中性粒细胞可通过氧化爆发和脱颗粒来释放氧自由基(O_2^-)和多种细胞内容物如髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)等来杀灭病菌[1]。但是当中性粒细胞被过度激活后,会大量聚集在血管内皮

[基金项目] 国家自然科学基金(30470988);教育部创新团队基金(IRT0712)
[通信作者] 周元国,电话:(023)68757471,E-mail:ygzhou@cta.cq.cn

上[2],释放其内容物、炎症介质,级联放大炎症反应,对机体造成损害,从而引起一系列疾病[3]。临床上常采用大剂量糖皮质激素冲击疗法来治疗上述急性炎症反应[4],这种快速治疗作用称为"非基因组效应"。但是糖皮质激素具体是通过何种机制发挥这种强大的抑制炎症反应的功能,尚有待研究。本实验以大鼠中性粒细胞和 U937 单核细胞株为对象,通过联合应用 ROCK 特异性抑制剂(法舒地尔)来探讨糖皮质激素快速抑制炎症细胞释放和黏附功能的作用机制与 RhoA/ROCK 信号通道的关系。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

SD 大鼠 12 只,4 ~ 6 周,雌雄不限,体质量约 200 g,购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。人单核巨噬细胞细胞株 U937、人脐静脉内皮细胞 HUVEC 均为第三军医大学大坪医院野战外科研究所分子生物学中心液氮保存。DMEM、RPMI1640 培养基和胎牛血清购于 GIBCO。PMA、地塞米松(Dex)、米非司酮(RU-486,M)、放线菌酮(CHX,C)均购于 Sigma 公司。法舒地尔(Fasudil,Fas)购于旭化成制药株式会社。Cell Couting Kit-8(CCK-8)和超氧化物检测试剂盒购于碧云天生物技术研究所。髓过氧化物酶(MPO)测试盒购于南京建成生物工程研究所。兔抗人抗 RhoA 抗体购于北京博奥森公司。兔抗人 ROCK1 抗体购于 SantaCruz 公司。RhoA 活性测定试剂盒购于 Neweast 公司。ROCK1 活性检测 ELISA 试剂盒购于 Cyclex 公司。Protein A/G 磁珠购于 Pierce 公司。山羊抗小鼠/兔的二抗购于 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞分离及培养 大鼠外周血中性粒细胞分离实验采用大鼠中性粒细胞分离液(TBD 公司)。按其说明书操作进行。U937 细胞和 HUVEC 细胞分别在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640和含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养。细胞常规放置于 37℃、5% CO2 的细胞孵育箱中孵育。

1.2.2 中性粒细胞释放 O_2^- 和 MPO 的检测 调整细胞密度为 5×10^5 个/ml,将细胞置于 24 孔板中,每组 3 个孔。分组如下:①对照组;②PMA(200 ng/ml)组;③PMA + Dex(10^{-6} mol/L)组;④PMA + Dex(10^{-6} mol/L) + RU-486(10-4 mol/L)组;⑤PMA + Dex(10^{-6} mol/L) + CHX(10^{-4} mol/L)组;⑥PMA + Fas(100 μmol/L)组[5]。反应 30 min 后终止反应,测定步骤按照试剂盒内说明书进行。处理组均与对照组相对比。

1.2.3 U937 与 HUVEC 细胞黏附水平测定 用 CCK-8 法测得的 OD 值反应细胞数。处理组 OD 值减去已贴壁的 HUVEC 细胞数基础值,即测得黏附上的 U937 细胞数目。96 孔板中每孔加入加入 4×10^3 个 HUVEC,孵育 12 h。待细胞贴壁后后每孔加入 5×10^4 个 U937 细胞。分组处理情况同上。孵育 30 min 后,弃上清,PBS 吹洗 2 次。每孔加入 CCK-8 溶液后,孵育 1 ~ 2 h,在 450 nm 波长下使用酶标仪检测 OD 值。以 OD 值反映细胞黏附量。

1.2.4 ROCK1 活性测定 收集处理后的 U937 细胞。采用 Pull down 法收集各组中 U937 细胞 ROCK1 蛋白,等量分置于 EP 管中。每管加入 5 μl 抗-ROCK1 抗体,室温摇晃 1 ~ 2 h。每管中加入 25 μl 磁珠,室温混匀,1 h。收集磁珠轻洗 2 ~ 3 次后。收集 ROCK1 蛋白留作活性测定[6]。ELISA 法检测 ROCK1 的活性参照 Cyclex 说明书进行。使用 $D(450)/D(540)$ 测定其吸光度。将处理组均与对照组相对比。

1.2.5 ROCK1 mRNA 表达水平测定 使用 Trizol 法提取总 RNA,经紫外定量分析后使用逆转录试剂盒(TaKaRa 公司)进行逆转录。再使用实时荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)进行定量。引物序列:ROCK1 上游:5′-ATGAGTTTATTCCTACACTCTACCACTTTC-3′;下游:5′-TAACATGGCATCTTCGACACTCTAG-3′,GAPDH 上游:5′-ACACCCACTCCTCCACCTTT-3′;下游:5′-TAGCCAAATTCGTTGTCATACC-3′。PCR 反应条件为:95 ℃ 4 min,95 ℃ 30 s,59 ℃ 15 s,72 ℃ 15 s,40 次循环[7]。GAPDH 作为内参。

1.2.6 RhoA 活性测定 收集处理后的 U937 细胞,提取总蛋白。每管等量加入蛋白提取物,用 1 × 裂解 Buffer 将蛋白提取物中液体调至 1 ml 体积。加入 1 μl 的抗-活化 RhoA 抗体和 20 μl 的磁珠悬液,摇晃 1 h,4 ℃。使用 1 × 裂解 Buffer 洗 3 遍,收集磁珠。加入 20 μl 上样缓冲液重悬磁珠。样品煮沸 5 min 后 5 000 × g,离心 10 s。使用 Western blot 测定活化 RhoA 蛋白变化情况。将处理组与对照组相比较。

1.2.7 RhoA 及 ROCK1 蛋白表达测定 提取细胞总蛋白后定量。取 30 μg 总蛋白与 2 × Loading buffer 煮沸后以 7.5% SDS PAGE 凝胶电泳分离。湿转蛋白至 PVDF 膜,室温封闭 5 h 后,加入抗 RhoA 一抗(1∶300)和抗 ROCK1 一抗(1∶500),室温孵育 2 h。然后分别加入山羊抗小鼠/兔的二抗(1∶5 000)。ECL 化学发光法显示结果并压片曝光。Labworks 4.6 图像分析软件分析条带灰度值,使用 β-actin 作为内参[8]。

1.3 统计学处理

上述实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,分别使用 Sigmaplot 11.0 和 SPSS 17.0 分别进行绘图及统计学分析。多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 PMA、地塞米松和法舒地尔对中性粒细胞释放 O_2^- 和 MPO 的影响

当使用 PMA(200 ng/ml)作为中性粒细胞的刺激剂时,中性粒细胞中释放出 O_2^- 和 MPO 的水平较对照组有明显升高($P < 0.05$),提示刺激较明显。10^{-6} mol/L 的 Dex 可以有效抑制中性粒细胞的释放($P < 0.05$),而 100 μmol/L 的法舒地尔抑制效果并不显著,与对照组之间无明显差异($P > 0.05$)。PMA + Dex + M 组、PMA + Dex + C 组与 PMA + Dex 组相比并无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 地塞米松和法舒地尔均可抑制 U937 细胞的黏附水平

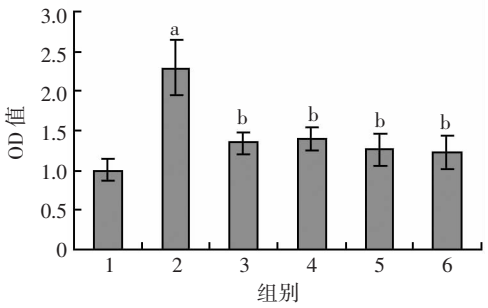
加入 PMA 刺激后,U937 细胞的黏附率较之未刺激组明显提高($P < 0.01$)。当加入地塞米松和法舒地尔后黏附率显著低于 PMA 刺激组($P < 0.01$)。此外,PMA + Dex + M 组、PMA + Dex +

C组与PMA+Dex组相比并无显著性差异($P>0.05$)(图1)。

表1 PMA、地塞米松和法舒地尔对中性粒细胞释放 O_2^- 和MPO影响($n=3, \bar{x}\pm s$)

组别	O_2^-	MPO
对照组	1.00±0.09	1.00±0.07
PMA组	1.95±0.10[a]	1.75±0.08[a]
PMA+Dex组	1.25±0.10[b]	1.07±0.06[b]
PMA+Dex+M组	1.31±0.08[b]	1.12±0.09[b]
PMA+Dex+C组	1.30±0.07[b]	1.13±0.01[b]
PMA+Fas组	1.84±1.13	1.64±0.04

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与PMA组比较

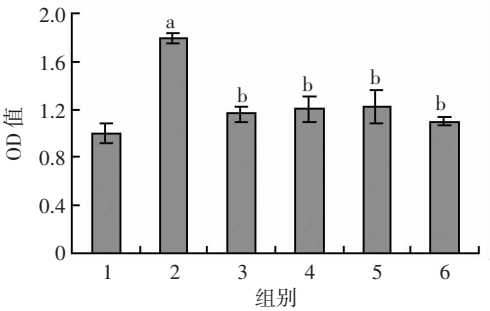


1:对照组;2:PMA组;3:PMA+Dex组;4:PMA+Dex+M组;5:PMA+Dex+C组;6:PMA+Fas组; a: $P<0.01$,与对照组比较; b:$P<0.01$,与PMA组比较

图1 各处理组中U937细胞的黏附情况

2.3 地塞米松和法舒地尔均可抑制U937细胞内ROCK1的活化

由图2结果显示,当U397细胞加入PMA刺激后,ROCK1的活性较对照组有明显增加($P<0.05$)。地塞米松和法舒地尔可以有效抑制ROCK1的活性($P<0.05$)。而PMA+Dex+M组、PMA+Dex+C组与PMA+Dex组相比并无显著性差异($P>0.05$)。

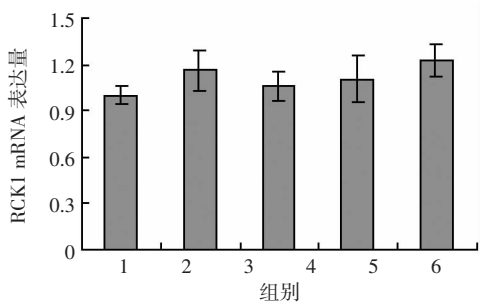


1:对照组;2:PMA组;3:PMA+Dex组;4:PMA+Dex+M组;5:PMA+Dex+C组;6:PMA+Fas组; a: $P<0.05$,与对照组比较; b:$P<0.05$,与PMA组比较

图2 各组U937细胞中ROCK1活性变化

2.4 地塞米松对U937细胞内ROCK1 mRNA表达的影响

地塞米松对U937细胞内ROCK1 mRNA的表达无明显影响,图3提示各组间ROCK1的mRNA变化情况无明显差异($P>0.05$)。

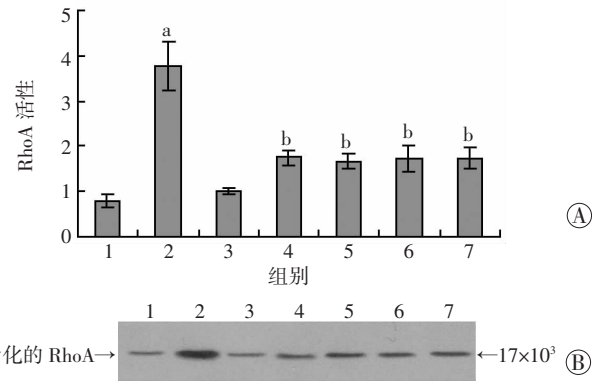


1:对照组;2:PMA组;3:PMA+Dex组;4:PMA+Dex+M组;5:PMA+Dex+C组

图3 各组间U937细胞内ROCK1 mRNA表达情况

2.5 地塞米松对U937细胞内RhoA的活化的抑制作用

图4结果显示,阳性对照显著性高于阴性对照,说明实验质量控制较好($P<0.01$)。PMA显著性增加RhoA的活性($P<0.05$)而其余各组间:PMA组、PMA+Dex组、PMA+Dex+M组、PMA+Dex+C组的RhoA活性并无明显差异($P>0.05$)。

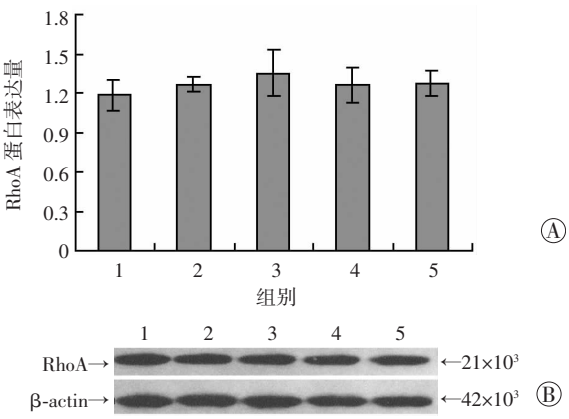


A:半定量分析结果;B:Western blot检测结果 1:阴性对照组;2:阳性对照组PMA组;3:对照组;4:PMA组;5:PMA+Dex组;6:PMA+Dex+M组;7:PMA+Dex+C组; a: $P<0.01$,与阴性对照组比较; b:$P<0.05$,与PMA组比较

图4 Western blot检测各组U937细胞中活化的RhoA蛋白含量变化

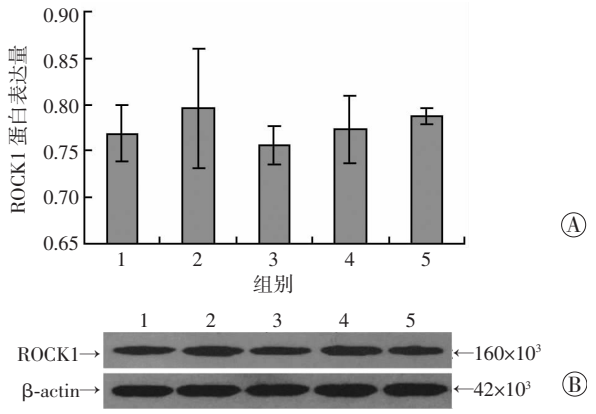
2.6 各组间U937细胞内RhoA和ROCK1的蛋白变化

各处理组间的RhoA及ROCK1的蛋白含量没有明显变化($P>0.05$)(图5、6)。



A:半定量分析结果;B:Western blot检测结果 1:对照组;2:PMA组;3:PMA+Dex组;4:PMA+Dex+M组;5:PMA+Dex+C组

图5 Western blot检测各组U937细胞中RhoA蛋白的表达



A:半定量分析结果;B:Western blot 检测结果 1:对照组;2:PMA 组;3:PMA + Dex 组;4:PMA + Dex + M 组;5:PMA + Dex + C 组

图 6 Western blot 检测各组 U937 细胞中 ROCK1 蛋白的表达

3 讨论

多种炎症反应对机体的损伤机制主要是由于中性粒细胞释放颗粒内容物如超氧化物阴离子(O_2^-)和 MPO 对血管内皮细胞造成损伤,并且释放大量细胞因子诱导更多的白细胞黏附在血管内皮和上皮细胞。因此,抑制中性粒细胞释放和降低白细胞对内皮细胞的黏附成为治疗急性炎症的首要环节。糖皮质激素在抗炎方面除了人们熟知的基因组效应外,还可通过非基因组效应发挥作用[9]。但后者的作用机制尚不清楚。

我们前期研究发现糖皮质激素在快速抑制炎症阶段的作用呈剂量依赖性,而非时间依赖性。10^{-6} mol/L 地塞米松可以有效快速抑制炎症反应。在本实验中进一步发现,10^{-6} mol/L 的地塞米松在 30 min 内可以显著性抑制中性粒细胞释放氧自由基(O_2^-)、髓过氧化物酶(MPO)和 U937 单核细胞的黏附,且该过程并不能够被糖皮质激素受体拮抗剂——米非司酮(RU-486)和蛋白质合成抑制剂——放线菌酮(CHX)所抑制。提示该过程并不是通过经典的基因组效应,而是通过非基因组效应发挥作用。

近年来,炎症疾病中的关键调节分子 ROCK(rho-associated coiled-coil protein kinase)引起人们越来越多的关注。ROCK 属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,以两种同源性极高的异构体形式存在(ROKα/ROCK2 和 ROKβ/ROCK1)。已被证实 ROCK 在急性肺损伤、心血管疾病[10-11]和缺血性脑损害[12]等多种炎症疾病中起重要作用。且有学者证明 ROCK 的两种亚型中,ROCK1 对于炎性细胞的黏附、浸润起重要调节作用,ROCK2 则无此作用[13]。由此推断出在炎症细胞黏附过程中起主要作用的是 ROCK1 而非 ROCK2。本研究在此基础上,发现 ROCK 抑制剂(法舒地尔)同样可在短期内显著性降低 U937 细胞的黏附,但对中性粒细胞的释放并无明显影响。该结果提示 ROCK1 是单核细胞黏附的关键调节分子,而并不在中性粒细胞释放过程起主要作用。本研究发现地塞米松可在短期内显著性抑制 ROCK1 的活性,而不对其蛋白表达产生影响,且该作用并不被米非司酮和放线菌酮所扭转。

以上结果提示地塞米松以 ROCK1 依赖方式通过非基因组效应抑制 U937 单核细胞的黏附,而以非 ROCK1 依赖方式抑制中性粒细胞释放。该实验的部分结果与 Rubenstein [6]的实验结果相吻合。

RhoA 作为 ROCK1 的经典上游效应分子,可通过直接结合 ROCK1 的 Rho 结合域(rho-binding domain,RBD)来激活 ROCK1,在 ROCK1 活性调节中起到了重要作用[14]。糖皮质激素是否通过调节 RhoA 来影响 ROCK1 的活性变化,尚不得而知。本研究结果提示在此短时效应中,地塞米松对 RhoA 的活性及蛋白表达无明显影响,提示地塞米松并以非 RhoA 依赖途径抑制 ROCK1 活性。

参考文献:

[1] Badwey J A, Karnovsky M L. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes[J]. Annu Rev Biochem, 1980, 49: 695-726.
[2] Matsuda N, Hattori Y. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy[J]. J Pharmacol Sci, 2006, 101(3): 189-198.
[3] Aldridge A J. Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome[J]. Eur J Surg, 2002, 168(4): 204-214.
[4] Clark A R. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes [J]. Mol Cell Endocrinol, 2007, 275(1/2): 79-97.
[5] Slotta J E, Braun O O, Menger M D, *et al*. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, inhibits leukocyte adhesion in inflamed large blood vessels in vivo[J]. Inflamm Res, 2006, 55(9): 364-367.
[6] Rubenstein N M, Callahan J A, Lo D H, *et al*. Selective glucocorticoid control of Rho kinase isoforms regulate cell-cell interactions[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354(2): 603-607.
[7] Ho C C, Lai K C, Hsu S C, *et al*. Benzyl isothiocyanate (BITC) inhibits migration and invasion of human gastric cancer AGS cells *via* suppressing ERK signal pathways[J]. Hum Exp Toxicol, 2010, 30(4): 296-306.
[8] Liu X, Li P, Liu P, *et al*. The essential role for c-Ski in mediating TGF-beta1-induced bi-directional effects on skin fibroblast proliferation through a feedback loop[J]. Biochem J, 2008, 409(1): 289-297.
[9] Zen M, Canova M, Campana C, *et al*. The kaleidoscope of glucorticoid effects on immune system[J]. Autoimmun Rev, 2011, 10(6): 305-310.
[10] Rikitake Y, Oyama N, Wang C Y, *et al*. Decreased perivascular fibrosis but not cardiac hypertrophy in ROCK1$^{+/-}$ haploinsufficient mice [J]. Circulation, 2005, 112(19): 2959-2965.
[11] Lu G, Hein T W, Kuo L, *et al*. Rho Kinase-mediated Coronary Arteriolar Constriction to Endothelin-1: Mechanistic Implications for Cardiac Syndrome X[J]. Translational Biomedicine, 2010, 1(2): .
[12] 赵红, 胡松, 张拥波, 等. Rho 激酶与脑血管疾病[J]. 神经损伤与功能重建, 2008, 3(5): 357-359.
[13] Noma K, Rikitake Y, Oyama N, *et al*. ROCK1 mediates leukocyte recruitment and neointima formation following vascular injury[J]. J Clin Invest, 2008, 118(5): 1632-1644.
[14] Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour[J]. Biochem Soc Trans, 2005, 33(Pt 5): 891-895.

(**收稿**:2012-03-19;**修回**:2012-04-06)
(编辑 王 红)