DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.007
第26卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 10
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)10-0859-04

论著

TNF-α对大鼠肺微血管内皮细胞β-受体及其相关GRKs的影响

肖贞良,钱桂生,孙耕耘 (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 探讨肿瘤坏死因子α(TNF-α)对肺微血管内皮细胞(PMVEC)β-受体(β-AR)和β-AR相关的G蛋白偶联受体激酶(GRKs)的影响及山莨菪碱的干预作用。方法 采用放射性配基结合法观察TNF-α作用后大鼠PMVECβ-AR最大结合容量Bmax的变化;采用Western blot观察与β-AR相关的GRKs在蛋白水平的表达及TNF-α的影响。结果 大鼠PMVECβ-AR的最大结合容量Bmax为(5.58±0.31)fmol/10^5细胞;TNF-α组β-AR的Bmax显著低于对照组,TNF-α+山莨菪碱组β-AR的Bmax与对照组比较无显著差异;大鼠PMVEC GRK2蛋白表达为阳性,但GRK3、GRK5和GRK6表达为阴性;TNF-α组和TNF-α+山莨菪碱组GRK2蛋白表达较正常对照组显著增高。结论 大鼠PMVEC表达GRK2,但不表达GRK3、GRK5和GRK6;TNF-α诱导的GRK2表达增高可促进β-AR的磷酸化,从而促进β-AR与G蛋白失偶联和β-AR的内化,这可能是TNF-α致大鼠PMVECβ-AR下调的主要机制;山莨菪碱不是通过抑制GRK2表达增加,而是通过其它机制抑制TNF-α引起的β-AR下调。

关键词:肿瘤坏死因子α;β-受体;G蛋白偶联受体激酶;微血管内皮细胞;大鼠
中图法分类号:R322.13;R560.2;R730.3 文献标识码:A

Effects of tumor necrosis factor alpha on beta-adrenoceptor and beta-adrenoceptor related GRKs in rat PMVEC

XIAO Zhen-liang, QIAN Gui-sheng, SUN Geng-yun (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of tumor necrosis factor α (TNF-α) on β-adrenoceptor (β-AR) and β-AR related G protein coupled receptor kinases (GRKs) in rat pulmonary microvascular endothelial cells (PMVECs) as well as the interfering action of anisodamine. Methods Radio-ligand binding assay was used to measure the maximal binding capacity (B_{max}) changes of β-AR in rat PMVECs after treatment with TNF-α. The effects of TNF-α and β-AR related GRKs expression at the protein level were observed by Western blotting. Results B_{max} of β-AR in normal rat PMVECs was (5.58±0.31) fmol/10^5 cells. B_{max} of β-AR in TNF-α group decreased significantly as compared with that in the normal control group, but no significant difference was found between the normal control group and TNF-α+anisodamine group. The expression of GRK2 in rat PMVECs was positive, but expression of GRK3, GRK5, and GRK6 were negative. The expression of GRK2 in TNF-α group and TNF-α+anisodamine group increased significantly as compared with that in the normal control group, but no significant difference was found between the TNF-α group and the TNF-α+anisodamine group. Conclusion GRK2 but not GRK3, GRK5, or GRK6 is expressed in rat PMVECs. The increased expression of GRK2 induced by TNF-α in rat PMVECs might promote the phosphorylation of β-AR, leading to β-AR internalization and decoupling with G protein, which might be the main mechanism of down-regulation of β-AR induced by TNF-α. Anisodamine might inhibit the down-regulation of β-AR through other mechanism instead of inhibiting the increase of GRK2 expression.

Key words: tumor necrosis factor alpha; beta-adrenoceptor; G protein coupled receptor kinase; microvascular endothelial cell; rat

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070334, 39730210);全军医学科研"十五"计划重点课题(01Z074)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070334, 39730210) and the Key Research Project of Medicine and Health of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01Z074)
作者简介:肖贞良(1965-),男,四川省邛崃市人,博士,主治医师,主要从事急性肺损伤发生机制方面的研究,现在成都军区总医院呼吸科。电话:(028)86570345
通信作者:钱桂生,电话:(023)68755603
收稿日期:2004-02-24;修回日期:2004-04-02
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

肺微血管内皮细胞(pulmonary microvascular endothelial cell, PMVEC)是构成气血屏障的主要成份,是急性肺损伤(acute lung injury, ALI)过程中肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor α, TNF-α)等致炎因子作用的主要靶细胞。我们既往发现,TNF-α 可致大鼠 PMVEC 单层通透性的增高,其机制与 β-受体(β-AR)下调有关[1]。G 蛋白偶联受体激酶(G protein coupled receptor kinases, GRKs)家族中的 GRK2、GRK3 是 β-AR 主要的调节蛋白,GRK5、GRK6 也参与了 β-AR 的调节。本研究主要探讨 TNF-α 对大鼠 PMVEC β-AR 和 β-AR 相关 GRKs 的影响,以及山莨菪碱的干预作用;结合我们既往工作,可进一步阐明 β-AR、β-AR 相关 GRKs 与内皮屏障功能调节的关系和 ALI 的发生机制。

1 材料和方法

1.1 大鼠 PMVEC 的分离、培养

按照文献[2]方法进行。取体质量约 150 g 的健康雄性 Wistar 大鼠(第三军医大学实验动物中心提供)1 只,速眠新腹腔注射麻醉,同时腹腔注射肝素钠 3 000 U。消毒后切断颈动脉放血活杀。打开胸腔,从右心灌注 DMEM 培养基(Hyclone 产品)50 ml,取出肺脏充分冲洗,剥去脏层胸膜,取表面 3~5 mm 的外周肺组织,切割至 1 mm^3 大小,DMEM 培养基冲洗后均匀放置在培养瓶内,间距约 1 cm。置含 5%CO_2 细胞培养箱内孵育 2 h 后,加入含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基。放入细胞培养箱内静置培养 60 h 后去除组织块。第 1~2 周 80%~90%细胞单层汇合时消化传代。实验用 2~5 代细胞。

1.2 正常大鼠 PMVEC β-AR 饱和曲线的制作

将大鼠 PMVEC 用 0.5%胰蛋白酶消化,Tris 缓冲液制成细胞悬液并计数。反应在 Tris 缓冲液中进行,每反应管加大鼠 PMVEC 10^5(100 μl);加入[^{3}H]-双氢烯丙洛尔([^{3}H]-DHA,比活性为 120.0 Ci/mmol, DU PONT 公司产品)50 μl,终浓度分别为 0.05、0.1、0.2、0.4、1、2 nmol/L。非特异性结合管加入阿普洛尔(Sigma 公司产品)50 μl(终浓度为 2 μmol/L);各管加 Tris 缓冲液使反应总体积为 250 μl,复管操作。37 ℃水浴反应 40 min,立即置冰浴中终止反应,并迅速经玻璃纤维滤膜(上海虹光造纸厂)进行负压抽滤(0.6×10^3),各管加 Tris 缓冲液冲洗 5 ml×2 次,滤膜于 80 ℃烘烤 30 min 后置液闪烁瓶内,每瓶加甲苯闪烁液 5 ml(含 0.4%的 PPO 和 0.01%POPOP)。静置 8 h 后用 FJ-2101 双道液闪计数仪检测其放射性(cpm)。总结合管与非特异性结合管之差为特异性结合。根据 Scatchard 公式制作饱和曲线并求出 β-AR 的最大结合容量 B_{max} 和平衡解离常数 Kd[3]。

1.3 TNF-α 对大鼠 PMVEC β-AR 的影响

用放射性配基([^{3}H]-DHA)结合法,参照饱和曲线用单点法检测 5 000 U/ml TNF-α(Sigma 产品)作用 90 min 后大鼠 PMVEC β-AR 的最大结合容量 B_{max} 的变化。每反应管加大鼠 PMVEC 100 μl(1×10^5);加[^{3}H]-DHA 50 μl,反应终浓度为 10 nmol/L(为制作饱和曲线时最大游离配基浓度的 5~10 倍);非特异结合管加入阿普洛尔 50 μl,反应终浓度为 10 μmol/L。各管加 Tris 缓冲液使反应总体积为 250 μl,3 管同时操作。其它步骤同饱和曲线的制作。计算并比较各组 B_{max} 值,以正常大鼠 PMVEC 作对照。

1.4 Western blot 检测 TNF-α 对大鼠 PMVEC GRK2、GRK3 蛋白表达的影响

1.4.1 实验分组 将大鼠 PMVEC 培养在 100 ml 培养瓶内,80%单层汇合时进行实验。取 12 瓶细胞随机分为正常对照组、TNF-α 组和 TNF-α+山莨菪碱组(n=4)。TNF-α 组每瓶加 5 000 U/ml TNF-α,TNF-α+山莨菪碱组每瓶加 5 000 U/ml TNF-α+10 μg/ml 山莨菪碱(天津药业产品),正常对照组每瓶加等量稀释液。90 min 后去除培养液,每瓶加 PBS 2 ml 冲洗后进行进行后续操作。

1.4.2 蛋白提取和定量 每个 100 培养瓶加 1 ml 冰冷的细胞裂解液[50 mmol/L pH 8.0 Tris.HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.02%叠氮钠, 100 μg/ml 苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 1 μg/ml aprotinin, 1% Triton X-100],用自制橡胶刮均匀刮下培养瓶底的细胞残留物。收集细胞裂解液至 EP 管中,1 500 g,4 ℃离心 10 min,取上清用紫外分光光度计进行蛋白定量,并将蛋白调整至 0.5 mg/ml。

1.4.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 根据目的蛋白分子量大小选择 8%的分离胶和 3%的浓缩胶进行 SDS-PAGE。每个泳道点样 20 μl(蛋白样品和上样缓冲液 1∶2),marker 点样 10 μl。电泳完成后用 R250 考马斯亮蓝染色,脱色液脱色,观察是否有需要的条带。相关试剂配制参照文献[4]进行。结果用 SK-100 Image System 凝胶成像系统扫描存盘。

1.4.4 Western blot 分析 根据凝胶大小剪取聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜,甲醇浸泡,双蒸 H_2O 漂洗,转移缓冲液平衡 5 min;用半干电转仪按说明书将蛋白转移至 PVDF 膜,并在 0.02%的氨基黑中快速染色,直至分子量标准显现时取出,记录下标准位置。100 ml 水洗涤 PVDF 膜,脱色缓冲液漂洗 10 min。将膜封入保鲜袋中,加封闭液[5%脱脂奶粉,0.05%tween-20, Tris 缓冲盐(Tris buffer saline, TBS)溶解]封闭 90 min。然后加封闭液 1∶1 000 稀释的一抗(GRK2 或 GRK3 多抗,Santa Cruz 产品)4℃过夜。含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗膜 5 min×3。室温下与结合有 HRP 的二抗孵育 90 min。二抗用封闭液稀释至 1∶1 000。含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗膜 5 min×3 次,再用 TBS 洗膜 5 min。将膜置 DAB 中显色,直至显出清晰条带。结果用 SK-100 Image System 凝胶成像系统扫描存盘,并比较各条带光密度。

1.5 Western blot 检测 GRK3

方法和步骤同 1.4。

1.6 统计学处理

结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 软件行方差分析及组间多重比较。

2 结果

2.1 大鼠 PMVEC 的分离、培养和鉴定结果

大鼠 PMVEC 主要呈多角形、短梭形,呈铺路石状排列,分

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

裂相细胞呈类圆形, 颜色浅淡, 呈单层贴壁生长(图 1); 表现出接触抑制现象, 即细胞完全单层汇合后停止分裂。经鉴定形态和生物学特性均与大鼠 PMVEC 相符[2]。

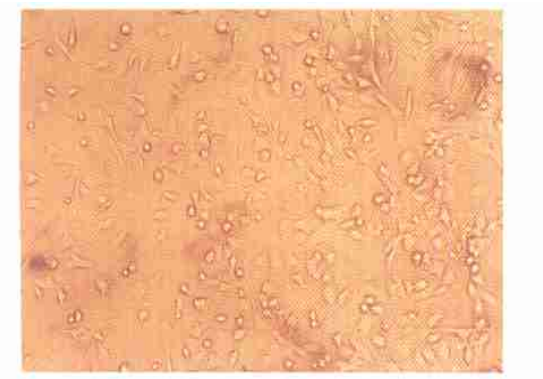
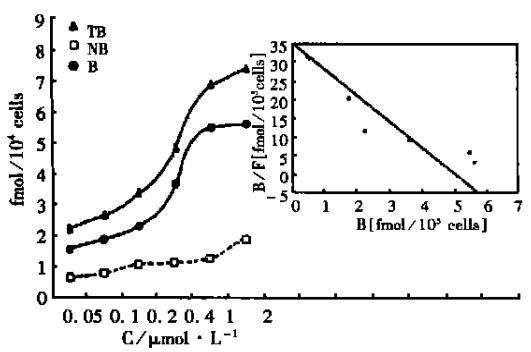


图 1　单层汇合的正常大鼠 **PMVEC**　(倒置显微镜× 100)

Fig 1　Normal rat PMVECs in monolayer confluence　(phase-contrast microscope× 100)

2.2　正常大鼠 PMVEC β-AR 的饱和曲线和 Scatchard 图

正常大鼠 PMVEC β-AR 的饱和曲线和 Scatchard 图(图 2)。根据饱和曲线和 Scatchard 图求出 β-AR 的最大结合容量 B_{max} 为(5.58±0.31) fmol/105 细胞, Kd 值为(0.27±0.03) nmol/L。



TB: Total binding; NB: Nonspecific binding; B: Specific binding; B/F: Ratio of specific binding to free ligand

图 2　正常大鼠 **PMVEC** β-**AR** 与[^{3}H]-**DHA** 结合的饱和曲线和 **Scatchard** 图

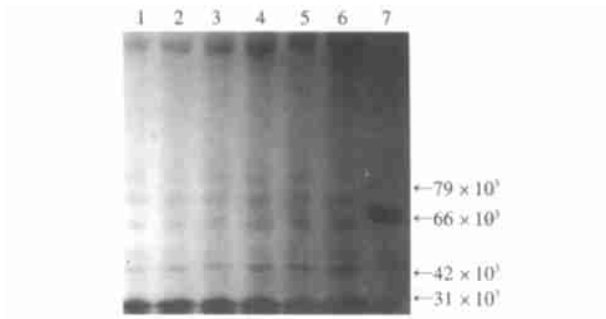
Fig 2　Saturation curve and Scatchard plot of β-**AR binding with** [^{3}H]-**DHA in normal rat PMVECs**

2.3　TNF-α 对大鼠 PMVEC β-AR 的 B_{max} 影响及药物干预

正常对照组 B_{max} 为(6.004±0.287) fmol/10^5 cell, 而 TNF-α 组 B_{max} 为(4.670±0.591) fmol/10^5 cell, TNF-α+山莨菪碱组 B_{max} 为(6.388±0.350) fmol/10^5 cell。TNF-α 组β-AR 的 B_{max} 显著低于对照组, $P<0.05$。TNF-α+山莨菪碱组β-AR 的 B_{max} 与对照组比较无显著差异, $P>0.05$。

2.4　SDS-PAGE 和 Western blot 结果

GRK2 分子量为 79× 10^3, 故 79× 10^3 处的蛋白条带为本实验所需条带。GRK3、GRK6 分子量为 70× 10^3, GRK5 分子量为 69× 10^3, 而大鼠 PMVEC 细胞裂解液 SDS-PAGE 结果在 69× 10^3 和 70× 10^3 附近未发现蛋白条带。大鼠 PMVEC 裂解液 SDS-PAGE 结果见图 3。

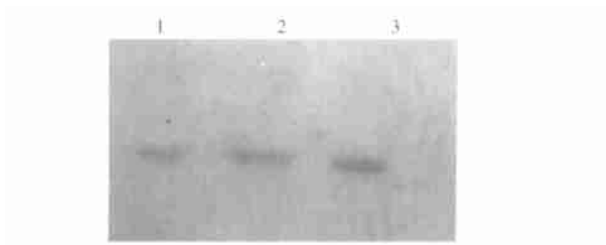


1: Marker; 2—7: Rat PMVEC lysates

图 3　大鼠 **PMVEC** 裂解液 **SDS-PAGE** 结果

Fig 3　SDS-PAGE analysis of rat PMVEC lysates

Western blot 检测大鼠 PMVEC GRK2 表达结果见图 4, 可见 TNF-α 组和 TNF-α+山莨菪碱组 GRK2 杂交带显色明显较正常对照组深。通过测定条带光密度, 可比较不同条带中 GRK2 含量。设正常对照组条带 GRK2 含量为 1, 则 TNF-α 组和 TNF-α+山莨菪碱组条带的 GRK2 含量分别为(1.929±0.262)和(2.562±0.141)。与正常对照组比较, TNF-α 组和 TNF-α+山莨菪碱组条带的 GRK2 含量均显著增高, $P<0.01$; 提示 TNF-α 组和 TNF-α+山莨菪碱组 GRK2 表达较正常对照组增高。TNF-α+山莨菪碱组 GRK2 表达也较 TNF-α 组显著增高, $P<0.01$。Western blot 检测 GRK3 结果重复 3 次均为阴性。



1: Normal control group; 2: TNF-α group; 3: TNF-α+anisodamine group

图 4　**TNF**-α 对大鼠 **PMVEC GRK2** 蛋白表达的影响

Fig 4　Effects of TNF-α **on GRK2 expression in rat PMVECs**

3　讨论

1984 年 Steinberg[5] 首次报道内皮细胞存在 β-AR, 并用[^{125}I]-ICYP 检测出每个牛主动脉内皮细胞的 β-AR 结合位点为(21 500±2 900), Kd 值为(109±26) pmol/L。本研究采用[^{3}H]-DHA 检测到大鼠 PMVEC β-AR 的 B_{max} 为 5.58 fmol/10^5 细胞, Kd 值为(0.27±0.03) nmol/

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

L,证明大鼠PMVEC存在高亲和力的β-AR。

β-AR属G蛋白偶联受体,近年来发现G蛋白偶联受体的失敏和内化与GRKs关系密切。GRKs分为GRK1-GRK7 7种亚型,其中GRK2、GRK3主要参与β-AR调节,所以它们又分别称为β-受体激酶1(β-ARK1)和β-受体激酶2(β-ARK2)。GRK2的分子量为79×10^3[6],本实验SDS-PAGE结果提示在79×10^3处存在一条清晰的蛋白条带,Western blot结果证实为GRK2。GRKs主要分布在胞浆内,活化状态的GRKs移位至胞膜与GPCRs结合,参与GPCRs调节。β-AR在受到激动剂刺激后被活化的同时也触发了受体本身的失敏过程。GRK2在β-AR失敏过程中的作用是使β-AR磷酸化,GRK2可能主要作用于β-AR羧基末端的第355至364位氨基酸序列。磷酸化的β-AR对抑制蛋白β-arrestins具有募集作用,并与之形成受体信号转导复合体(receptor-signaling complex),导致受体与异三聚体的G蛋白失偶联和受体反应性的丧失[7,8]。

本实验表明,TNF-α组β-AR的B_{max}显著低于对照组,表明TNF-α可诱导大鼠PMVECβ-AR下调;本实验通过Western blot分析还发现,TNF-α作用后大鼠PMVEC GRK2在蛋白水平的表达较正常对照组显著增高,表明TNF-α作用后可引起大鼠PMVEC GRK2表达增加。TNF-α是一种具有广泛生物学作用的细胞因子。体内TNF-α的主要来源是活化的巨噬细胞,血管内皮细胞也可产生和分泌TNF-α。有关TNF-α作用后血管内皮细胞GRKs的变化及与β-受体的关系国内外少见文献报道。由于GRK2是β-AR的调节激酶,推测TNF-α作用引起的GRK2表达增高可促进β-AR的磷酸化,磷酸化的β-AR可与抑制蛋白β-arrestins结合,从而促进β-AR与G蛋白失偶联和β-AR的内化,这可能是TNF-α致大鼠PMVEC β-AR下调的主要机制。

GRK3是GRK2的同工酶,分子量为70×10^3。本实验SDS-PAGE结果在70×10^3处没有蛋白条带显示,Western blot检测结果均为阴性,表明大鼠PMVEC不表达GRK3,GRK3不参与PMVEC β-AR的调节。GRK5、GRK6是两种相关激酶,与GRK2、GRK3分别属于GRKs不同的亚家族;它们与GRK2、GRK3一样在全身各组织均有表达,主要参与凝血酶受体的调节。以前认为GRKs中仅GRK2、GRK3与β-AR调节有关,近来发现GRK5、GRK6也参与β-AR的调节[9]。GRK5、GRK6的分子量分别为69×10^3和70×10^3,本实验SDS-PAGE结果在70×10^3附近没有蛋白条带显示,表明大鼠PMVEC不表达GRK5和GRK6。GRK5和GRK6不参与PMVECβ-AR的调节。

山莨菪碱是一种M胆碱能阻滞剂,本实验中山莨菪碱可抑制TNF-α引起的大鼠PMVEC β-AR下调,但不能抑制TNF-α引起的大鼠PMVEC中GRK2的表达增加,表明山莨菪碱不是通过抑制GRK2表达增加,而是通过其它机制抑制TNF-α引起β-AR下调。

参考文献:

[1] 肖贞良,孙耕耘,夏前明,等. 肿瘤坏死因子致肺微血管内皮细胞单层通透性损伤的实验研究[J]. 中国应用生理学杂志,2001,17(1):79-81.

[2] 肖贞良,孙耕耘,钱桂生. 肺循环灌注对大鼠肺微血管内皮细胞分离和培养的影响[J]. 中国病理生理杂志,1999,15(11):1053-1054.

[3] 孙耕耘,毛宝龄,吕宝璋. 内毒素致大鼠肺损伤时肺组织β受体的变化与膜磷脂代谢的关系[J]. 中国应用生理学杂志,1994,10(1):67-69.

[4] J. 萨姆布鲁克,E. F. 弗里奇,T. 曼尼阿蒂斯著,金冬雁,黎孟枫等译. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京:北京科学出版社. 1996. 888-897.

[5] Steinberg S F, Jaffe E A, Bilezikian J P, *et al*. Endothelial cells contain beta adrenoceptors[J]. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1984, 325(4):310-313.

[6] Opperman M, Diverse-Pierluissi M, Drazner M H, *et al*. Monoclonal antibodies reveal receptor specificity among G-protein-coupled receptor kinases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(15):7649-7654.

[7] Krupnick J G, Benovic J L. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation[J]. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1998, 38(4):238-319.

[8] 肖贞良,孙耕耘,钱桂生,等. 脂多糖诱导急性肺损伤大鼠肺组织GRK2变化的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2002,24(10):1176-1178.

[9] 肖贞良,夏前明,钱桂生,等. G蛋白偶联受体失敏的分子机制[J]. 生命科学研究,2003,7(7):15-19.

(编辑 王 红)

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神,血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg),但首次使用时应注明mmHg与千帕[斯卡](kPa)的换算系数。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net