DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.029
第25卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 19
2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

文章编号:1000-5404(2003)19-1755-04

论著

PKC在LPS激活大鼠肺巨噬细胞核转录因子-κB中的作用

黎 庶,汪正清 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨蛋白激酶C(PKC)在LPS激活肺巨噬细胞核转录因子-κB信号传导通路中的作用。方法 采用夹心ELISA的方法检测巨噬细胞NF-κB的核内浓度;免疫组化染色观察LPS作用前后NF-κB的位置改变。结果 LPS刺激可诱导巨噬细胞NF-κB活化,二者之间存在时效与量效的依赖关系;免疫组化染色显示LPS作用后,NF-κB发生核内移位,由胞浆进入细胞核内;而特异性PKC抑制剂(Cal C)和NF-κB阻断剂(PDTC)均能在不同程度上抑制LPS的作用。结论 PKC作为NF-κB活化的上游信使,参与了LPS激活NF-κB的信号传导通路。

关键词:脂多糖;NF-κB;PKC;信号传导
中图法分类号:Q556.9;R392.11;R394.3 文献标识码:A

Roles of PKC in LPS-induced NF-κB activation of macrophages in rats

LI Shu, WANG Zheng-qing (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the roles of protein kinase C (PKC) in the signal transduction pathway of LPS-induced nuclear transcription factor (NF)-κB activation of alveolar macrophages (AMs). **Methods** NF-κB level in nuclear protein extraction of AMs was detected by sandwich ELISA. Intranuclear translocation of NF-κB was observed by immunocytochemical staining. **Results** LPS could induce NF-κB activation of AMs in time- and dose-dependent manners. Immunohistochemical staining revealed intranuclear translocation following LPS induction. Specific calphostin C (Cal C) and pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) could inhibit LPS-induced NF-κB activation. **Conclusion** PKC, as a up-stream messenger, is involved in the signal transduction pathway of LPS-induced NF-κB activation.

Key words: lipopolysaccharide; NF-κB; PKC; signal transduction

脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是诱发炎症损伤的主要致病物质之一,其致病作用的机制一直是人们关注和研究的热点。多年研究表明,LPS的致病作用可能涉及数条胞内信号通路及多种转录因子的参与,而PKC及核转录因子NF-κB都是其中的重要环节。但LPS激活肺巨噬细胞核转录因子NF-κB的机制及PKC在此信号传导通路中的作用还不是十分清楚。本实验以大鼠肺泡巨噬细胞(Alveolar macrophage, AM)为研究对象,以LPS刺激诱导AM中的NF-κB活化,然后进行分组实验,并同时采用蛋白激酶C (Protein kinase C, PKC)的特异性抑制剂(Calphostin C, Cal C)及NF-κB的阻断剂-咯啶二硫氨基甲酸酯(Pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)进行抑制试验,观察AM内NF-κB核内浓度的动态变化,以及PKC在LPS活化NF-κB中的作用,为LPS诱发的炎症损伤的防治提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

雄性Wistar大鼠购自第三军医大学实验动物中心,体质量180~200 g. LPS[O111:B4]、PDTC、Calphostein C、Leupeptin、Pepstain均购自美国Sigma公司,山羊抗NF-κB P65亚基多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,HRP标记的兔抗羊IgG购自北京中山试剂公司,免疫组化试剂盒(即用型SABC)及DAB显色试剂盒购自武汉博士德公司,其它试剂均为分析纯。

1.2 大鼠肺巨噬细胞的分离培养

将雄性Wistar大鼠在无菌条件下行气管插管,用4 ℃预冷的Hanks液6~10 ml反复灌洗肺部。收集灌洗液,以2 500 r/min离心15 min沉淀细胞,并以RPMI1640培养基重悬。台盼蓝染色证实活细胞比例>95%,瑞氏染色法证实肺巨噬细胞比例>90%者用于实验。将细胞密度调整至1×10^9/L,接种于细胞培养板中,置37 ℃、5% CO_2的孵箱中孵育,待巨噬细胞贴壁生长后进行实验。

1.3 LPS用量及作用时间的选择

LPS作用分两份进行:一份将LPS做10倍系列稀释(0.

作者简介:黎 庶(1972-),女,重庆市綦江县人,硕士,讲师,主要从事微生物致病机制方面的研究。电话:(023)68752239
通信作者:汪正清,电话:(023)68752242
收稿日期:2003-04-10;修回日期:2003-07-21

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

0.01、0.1、1及10 mg/L)后，分别加入各培养小室中刺激60 min；另一份将LPS稀释成1 mg/L加入各培养小室中刺激不同时间(0、5、15、30、60及120 min)，然后分别收集各培养小室中的细胞，测定NF-κB的核内水平以确定LPS的最佳用量和最佳作用时间。以上各实验组均重复5次，求平均值，各组均设正常对照组。

1.4 Cal C用量的选择

以不同浓度(0、30、100、300、500 nmol/L)的Cal C预作用30 min后，再用1 mg/L的LPS刺激60 min，检测NF-κB的核内水平，确定最佳的Cal C工作浓度。

1.5 实验分组

根据预实验结果进行分组，实验共分4组：①正常对照组：此组细胞不接受任何刺激；②LPS处理组：用1 mg/L的LPS作用60 min，检测细胞NF-κB的核内浓度；③Cal C阻断组(CalC+LPS)：以300 nmol/L的Cal C预处理30 min后，再用1 mg/L的LPS刺激60 min，检测细胞NF-κB的核内浓度；④PDTC阻断组(PDTC+LPS)：以200 μmol/L的PDTC预处理30 min后，再用1 mg/L的LPS刺激60 min，检测细胞NF-κB的核内浓度。

1.6 指标测定

1.6.1 夹心ELISA检测细胞的NF-κB活化

1.6.1.1 巨噬细胞核蛋白的提取 参照文献[3]的方法，稍加改动。于4 ℃以2 500 r/min冷冻离心10 min沉淀细胞，加入850 μl裂解液A(10 mmol/L Hepes-NaOH pH 7.9、10 mmol/L KCl、0.1 mmol/L EDTA、2 mmol/L $MgCl_2$、1 mmol/L DTT、1 mmol/L PMSF、5 mg/L leupeptin及2 mg/L pepstain)重悬细胞，放置冰上15 min后加入10% NP-40 25 μl，涡动10 s。于4 ℃以12 000 r/min冷冻离心5 min，收集沉淀的细胞核小团，加入50 μl裂解液B(20 mmol/L Hepes-NaOH pH 7.9、25% 甘油、0.42 mol NaCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L DTT、0.5 mmol/L PMSF及5 mg/L leupeptin)放置冰上30 min。于4 ℃以12 000 r/min冷冻离心10 min，收集上清(含核蛋白)，于−70 ℃储存。

1.6.1.2 Lowry法测定核蛋白浓度

1.6.1.3 NF-κB核内含量的测定 按参照文献[4]以夹心ELISA法测定。

1.6.2 NF-κB核转移的检测 采用免疫酶学的方法，按免疫组化试剂盒检测。

1.7 统计学处理

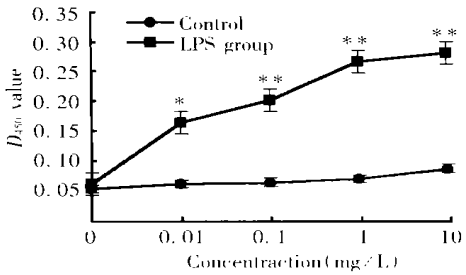
实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，进行双因素方差分析。

2 结果

2.1 LPS对大鼠AM NF-κB核内水平检测的影响

2.1.1 量效关系 当用不同浓度的LPS分别刺激细胞60 min时，细胞核内NF-κB的水平随着LPS作用浓度的增加而逐渐升高，但10 mg/L LPS的刺激效果与1 mg/L LPS相比较差异不太明显，见图1。于是将1 mg/L作为以后分组实验时LPS的作用浓度。

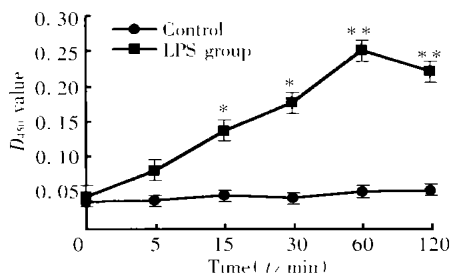
2.1.2 时效关系 于静息状态下，正常细胞核内也有一定浓度的NF-κB(D_{450}为0.055±0.005)，但与LPS作用组相比较，NF-κB水平极低。当用1 mg/L的LPS刺激大鼠AM不同时间，进入细胞核内的NF-κB水平即随刺激时间的延长而增高。于60 min时到达峰值(D_{450}为0.253±0.015)，但120 min时，NF-κB的核内水平反而出现降低(D_{450}为0.223±0.023)，故以刺激60 min作为LPS刺激的最佳时相，见图2。



*：$P<0.05$；**：$P<0.01$ *vs* control

图1 不同LPS作用浓度对NF-κB核内水平的影响

Fig 1 Effects of LPS at different concentrations on intranuclear NF-κB level



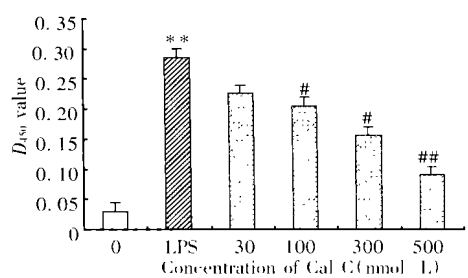
*：$P<0.05$；**：$P<0.01$ *vs* control

图2 一定量的LPS刺激不同时间对NF-κB核内水平的影响

Fig 2 Effects of LPS at different time on intranuclear NF-κB level

2.2 不同剂量Cal C对AM NF-κB核内水平的影响

先以Cal C处理后，1 mg/L LPS激活大鼠AM NF-κB的作用受到不同程度的抑制，抑制率分别为21.1%、28.1%、45.6%及68.4%。随着Cal C浓度的增加，抑制程度也增加。综合各种因素，将Cal C的工作浓度定为300 nmol/L，见图3。



**：$P<0.01$ *vs* control；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* LPS group

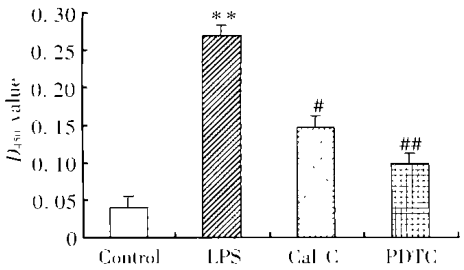
图3 不同浓度Cal C对NF-κB核内水平的抑制作用

Fig 3 Inhibitive effects of Cal C at different concentrations on intranuclear NF-κB level

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

2.3　分组实验结果

2.3.1　LPS、Cal C 及 PDTC 对 NF-κB 核内水平的影响　以 LPS (1 mg/L)、Cal C (300 nmol/L) 及 PDTC (200 μmol/L) 作用后, 检测 AM NF-κB 核内水平的结果表明, LPS 处理组 NF-κB 的 D_{450} 值显著高于正常对照组及 Cal C、PDTC 阻断组。用 Cal C 阻断后, NF-κB 核内水平 (D_{450} 值) 较 LPS 处理组明显降低 ($P<0.05$); 而用 PDTC 阻断后, 核内 NF-κB 的 D_{450} 值也明显低于 LPS 处理组 ($P<0.01$), 只是更接近正常对照组, 见图 4。



**: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* LPS group

图 4　LPS 及 Cal C、PDTC 对 NF-κB 核内水平的影响

Fig 4　Effects of LPS, Cal C and PDTC on intranuclear NF-κB level

2.3.2　LPS、Cal C 及 PDTC 对 NF-κB 核内移位的影响　实验分组及 LPS、Cal C、PDTC 用量同 2.3.1。免疫组化染色显示, 正常对照组的细胞主要为胞浆着色而胞核空染, 但也有少量胞核实染细胞出现, 可能与细胞分离、纯化及培养时的一些物理因素 (如冰冷的培养基、肺部的反复灌洗等) 的刺激有关。LPS 处理组的细胞着色主要位于细胞核内, 胞浆不着色或浅染, 表明 LPS 刺激后, NF-κB 活化并由胞浆转移到了细胞核内。LPS 刺激 15 min 时, 已有 NF-κB 核内移位的细胞; 刺激 60 min 时, 约 95% 的细胞表现为胞核实染。Cal C 和 PDTC 阻断组的细胞则表现为核空染与核实染混杂存在, 其中 PDTC 阻断组的细胞核空染现象较 Cal C 阻断组为多, 但都少于正常对照组。

3　讨论

3.1　LPS 可诱导肺巨噬细胞 NF-κB 激活

NF-κB 是一种序列特异性 DNA 结合蛋白, 为涉及免疫应答及炎症损伤的一类重要的多向性转录调控因子[1]。在静息状态下, NF-κB 二聚体 (主要为 P^{65}-P^{50} 二聚体) 与其抑制性蛋白 (IκB) 结合以三聚体的形式存在于胞浆中[5]。在细胞受到外界因素的刺激时, IκB 发生磷酸化[6]、泛素化, 最终为 26S 蛋白酶体降解[7]。NF-κB 与 IκB 解离后活化, 并发生核内移位, 此时 NF-κB 上暴露的核定位序列得以与靶基因上特定的 κB 位点结合, 启动相关基因的转录和表达, 参与细胞的炎症损伤、凋亡, 特别是与重症感染的发生等病理过程有着密切的关系。但 LPS 激活 NF-κB 诱导巨噬细胞活化的确切途径和机制仍然不甚明了。

本实验采用夹心 ELISA, 对 NF-κB 的核内水平进行测定。结果显示, LPS 能激活 NF-κB, 且 LPS 对 NF-κB 的活化具浓度依赖性和时间依赖性。当用不同浓度的 LPS 刺激 AM 60 min 时, NF-κB 的核内浓度随着 LPS 浓度增加而逐渐增高。0.01 mg/L 的 LPS 已能活化 NF-κB, 10 mg/L LPS 的刺激后最高。当用 1 mg/L LPS 刺激不同时间, NF-κB 的核内浓度随时间延长逐渐升高。刺激 5 min 就可见 NF-κB 活化, 60 min 达峰值, 120 min 时反略有下降, 这可能与 IκB-α 蛋白的再现有关。通常情况下, IκB 与 NF-κB 结合使之以无活性的形式存在于胞浆中。目前, 已知 IκB 家族有 8 个成员: P100、P105、IκB-α、IκB-β、IκB-γ、IκB-δ、IκB-ε 及 Bcl-3[5], 其中 IκB-α 和 IκB-β 较为常见。在 IκB-α 基因的启动子区域也含有 NF-κB 结合序列[8], 因此, NF-κB 活化后可引起 IκB-α 蛋白再生。新合成的 IκB-α 蛋白可重新与 NF-κB 结合而导致其活性下降, 甚至可进入核内与活化的 NF-κB 结合, 竞争性地抑制 NF-κB 与 DNA 上的 κB 序列结合, 抑制 NF-κB 的活性。而 NF-κB 的长时间激活则主要与 IκB-β 的持续降解相关, 因 NF-κB 不能诱导 IκB-β 再生, 胞浆中的 IκB-β 活性要在 24 h 后才会恢复[8]。分组实验结果证实, LPS 处理组 NF-κB 的 OD 值远高于正常对照组。免疫组化染色发现, LPS 刺激后, NF-κB 发生核内移位。核移位现象在 LPS 刺激 15 min 时已出现, 60 min 时最多。但用 PDTC 阻断后, NF-κB 核内水平较 LPS 作用组明显降低。免疫组化染色显示, 核空染的细胞增多, 接近正常对照组, 说明 LPS 刺激导致了 AM 内的 NF-κB 活化, 二者之间具有量效和时效的依赖关系。

3.2　LPS 通过激活 PKC 以诱导 NF-κB 的活化

PKC 家族是存在于胞浆内的磷脂依赖性丝/苏氨酸蛋白激酶, 至今已纯化出至少 11 种不同亚型的 PKC 同工酶, 分为传统型 (cPKC)、新型 (nPKC)、非典型型 (aPKC) 和 PKC-u 四大类[9]。每个激酶分子均由调节区 (包括 Ca2+ 及佛波酯 PMA 的结合点) 及催化区组成[9]。静息时, PKC 以非活性的形式存在胞浆中, 其催化区域被同一分子内的假底物序列所占据, 受到刺激后, 刺激物与 PKC 结合并使其发生别构效应而活化, 产生对底物的磷酸化[10]。LPS 能激活 PKC 已是一个不争的事实, 但在其所致 NF-κB 激活的过程中, PKC 到底发挥了何种作用, 众说不一。有的认为, LPS 可通过诱导胞膜中磷脂酰胆碱特异性磷脂酶 C (Phosphatidyl choline phosphalipase C, PC-PLC), 水解磷脂酰胆碱 (Phosphatidyl choline, PC) 生成甘油二酯 (Diacylglycerol, DAG)。DAG 可激活 PKC, 活化的 PKC 在 Ca^{2+} 的协助下可导致

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

IκB的磷酸化从而激活NF-κB[11]。也有人认为,在LPS激活NF-κB的过程根本是PKC非依赖性的[12]。本实验先用Cal C作用30 min阻断细胞中的PKC通路,再用LPS进行刺激,细胞核内的NF-κB水平与未阻断组相比较显著降低,说明Cal C在一定程度上能抑制LPS对NF-κB的激活,即PKC参与了LPS对NF-κB的激活。有实验显示,LPS刺激后PKC的活性在5 min内迅速升高,10~15 min达峰值,而后逐渐下降[13],PKC的激活明显先于NF-κB,这也是LPS通过激活PKC而诱导NF-κB活化的一个间接证据。但Cal C不能完全阻断LPS对NF-κB的激活,其抑制效应不及PDTC,表明PKC的作用比较局限。LPS活化NF-κB的过程可能还有其他信号通路参与。至于参与其中的PKC亚型还不得而知,只知Cal C是通过竞争性地结合于cPKC、nPKC调节区的甘油二酯及佛波酯结合位点,而发挥其抑制功能[14],这提示cPKC及nPKC的某些亚型也参与了LPS对NF-κB的活化,对此尚需进一步实验证明。

参考文献:

[1] Baldwin AS Jr. The NF-κappa B and I κappa B proteins: new discoveries and insights[J]. Annu Rev Immunol, 1996, 14: 649—683.

[2] Baeuerle P A, Henkel T. Function and activation of NF-κappa B in a immune system[J]. Annu Rev Immunol, 1994, 12: 141—179.

[3] Lentsch A B, Czermak B J, Bless N M, *et al*. NF-κB activation during IgG immune complex-induced lung injury: requirements for TNF-alpha and IL-1beta but not complement[J]. Am J Pathol, 1998, 152(5): 1327—1336.

[4] 郭甫坤,李亦蕾,吴曙光. Sandwich ELISA法测定NF-κB[J]. 中国药理学通报,2000,16(1):227—228.

[5] Whiteside S T, Israel A. I kappa B proteins: structure, function and regulation[J]. Semin Cancer Biol, 1997, 8(2): 75—82.

[6] Zandi E, Rothwarf D M, Delhase M, *et al*. The I κappa B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK-alpha and IKK-beta, necessary for I κappa B phosphorylation and NF-κappa B activation[J]. Cell, 1997, 91(2): 243—252.

[7] Dawson S, Hasting S R, Takayanagi K, *et al*. The 26S-proteasome: regulation and substrate recognition[J]. Mol Biol Rep, 1997, 24(1): 39—44.

[8] Blackwell T S, Christman J W. The role of nuclear factor-κappa B in cytokine gene regulation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17(1): 3—9.

[9] Azzi A, Boscoboinik D, Hensey C, *et al*. The protein kinase C family[J]. Eur J Biochem, 1992, 208(3): 547—557.

[10] 林明群,张宗粱. LPS和PMA诱导小鼠腹腔巨噬细胞的PKC-α和PKC-ε的激活及转位[J]. 实验生物学报,1996,29(4):429—434.

[11] Steffan N M, Bren G D, Frantz B, *et al*. Regulation of IκB-αphosphorylation by PKC- and Ca^{2+}-dependent signal transduction pathway[J]. J Immunol, 1995, 155(10): 4685—4691.

[12] Zhang J S, Feng W G, Li C L, *et al*. NF-kappa B regulates the LPS-induced expression of interleukin 12 p40 in murine peritoneal macrophages: roles of PKC, PKA, ERK, p38 MAPK, and proteasome[J]. Cell Immunol, 2000, 204(1): 38—45.

[13] Zhao Y, Davis H W. Endotoxin causes phosphorylation of MARCKS in pulmonary vascular endothelial cells[J]. J Cell Biochem, 2000, 79(3): 496—505.

[14] Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses[J]. FASEB J, 1995, 9(7): 484—496.

(编辑 陈聪连)

欢迎订阅《第四军医大学学报》

《第四军医大学学报》是面向中高级医学科学工作者、国内外公开发行的高级综合性医学学术期刊,创刊于1980年3月,半月刊,A4(大16开),96页,105 g铜版纸,彩图随文。该刊已进入我国各大检索体系及美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、俄罗斯文摘杂志(PЖ)、乌利希国际期刊指南、CAJ—CD光盘和Internet网等。该刊是首批国家科技源期刊和核心期刊,曾荣获首届国家期刊奖、第二届国家期刊奖提名奖和中国百种杰出学术期刊,其影响因子和被引频次均名列全国医学院校学报之首,主要刊载基础医学、临床医学、军事医学、口腔医学、航空医学、中医中药学、生物医学工程学等研究领域中所取得的新成果、新经验。请向当地邮局订阅(邮发代号52—86),也可来函我刊编辑部办理邮购,免收邮寄费(邮局汇款,请勿电汇)。每期定价10元,全年共240元。欢迎投稿,欢迎订阅。

地 址:西安市长乐西路169号《第四军医大学学报》编辑部 邮 编:710033

联系人:袁天峰 电 话:(029)3374674,3373456

网 址:http://dsijydxxb.periodicals.net.cn E-mail:edjfmmu@fmmu.edu.cn

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