DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.035
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1205-03

论著

ERK1/2信号通路参与LPS诱导小鼠腹腔巨噬细胞iNOS表达的调节

苏踊跃,罗向东,杨宗城 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨ERK1/2信号通路与LPS诱导的小鼠腹腔巨噬细胞iNOS表达的关系。方法 采用RT-PCR和蛋白免疫印迹方法观察ERK1/2信号通路特异性抑制剂PD98059对LPS诱导的iNOS表达的影响。结果 PD98059能够以剂量依赖方式抑制LPS诱导的小鼠腹腔巨噬细胞iNOS表达。结论 LPS诱导小鼠腹腔巨噬细胞iNOS表达部分依赖了ERK1/2信号通路。

关键词:脂多糖;巨噬细胞;诱导型一氧化氮合酶;ERK1/2
中图法分类号:R345.38;R392.11;R392.12 文献标识码:A

Involvement of ERK1/2 signal pathway in regulation of LPS induced iNOS expression in cultured murine peritoneal macrophages

SU Yong-yue, LUO Xiang-dong, YANG Zong-cheng (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship of extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) signal pathway with inducible nitric oxide (iNOS) expression in murine peritoneal macrophages (MPM) after LPS inducement. **Methods** The effects of PD98059, a specific inhibitor of ERK1/2, on LPS-induced iNOS expression were observed with RT-PCR and western blotting methods. **Results** PD98059 decreased the LPS induced iNOS expression in murine peritoneal macrophages in a dose-dependent manner. **Conclusion** LPS-induced iNOS expression partly depends on ERK1/2 signal pathway.

Key words: lipopolysaccharide; macrophages; inducible nitric oxide synthase; extracellular signal-regulated kinase 1/2

在细胞因子或微生物的刺激下巨噬细胞能分泌许多免疫效应分子如一氧化氮(Nitric oxide, NO)、IL-12等,从而在宿主抗感染免疫反应中起重要作用。巨噬细胞NO的产生主要受诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase, iNOS)调节,但是对于G-细菌脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导巨噬细胞iNOS表达的早期信号事件所知甚少。细胞外信号调节激酶(Extracellular signal-regulated kinases, ERKs)是致分裂原激活的蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)的主要成员之一,后者是把细胞外信号传递到核的重要信号系统,ERK信号则被认为是信号转导通路的中枢部分,参与调节细胞骨架,细胞生长及分化等[1]。鉴于ERK1/2信号在LPS诱导巨噬细胞iNOS表达过程中的作用尚不明确,在生长、修复、炎症等多种病理生理过程中发挥重要作用的ERK信号通路是否参与了巨噬细胞重要的效应分子NO生成的调节?对此深入地探讨将有助于我们对巨噬细胞NO介导的非特异性免疫反应早期信号事件的认识。

1 材料和方法

1.1 小鼠腹腔巨噬细胞(Murine peritoneal macrophages, MPMs)制备[2]

二月龄C57BL/6J小鼠由中科院上海生物化学和细胞生物学研究所动物室提供,小鼠腹腔注射灭菌的2 ml 5%巯基乙酸盐,3~4 d后处死,剪开腹壁腹膜,收集腹腔渗出细胞,以丁氏液裂解红细胞后培养于直径为9 cm培养皿,培养液为含10% FCS的RPMI1640,37 ℃、5% CO_2孵育1 h,去除非粘附细胞,用无血清的RPMI1640培养液清洗3次,并更换培养液。

1.2 半定量RT-PCR

MPMs培养于6孔板,以不同剂量的LPS处理6 h,提取细胞总RNA,研究PD98059对iNOS表达的作用时,PD98059以相应的剂量在LPS(100 ng/ml)刺激1 h前加入。用TRIzol试剂提取细胞总RNA,行逆转录。iNOS的引物设计参照文献[3],管家基因GAPDH作为内源性对照,引物均由生海生物工程公司合成,Taq酶用Takara公司产品,50 μl PCR反应体系中,含2.5 μl RT产物,50 pmol/L iNOS引物。PCR反应条件:94 ℃,45 s;54 ℃,45 s;72 ℃,60 s,26个循环。PCR反应产物以7%聚丙烯酰胺凝胶电泳,用改良银染法染色[4],分子量标准为Takara公司DL2000,扫描测定染色带密度并计算目的基因扩增产物与GAPDH扩增产物的相对比值。

1.3 蛋白免疫印迹

接种巨噬细胞于6孔板中,用不同剂量的PD98059预处理巨噬细胞1 h,再用100 ng/ml LPS刺激细胞8 h,检测iNOS蛋白诱导的表达。用SDS载样缓冲液收集细胞总蛋白,经SDS-PAGE,电转膜,抗体反应(抗小鼠iNOS多克隆抗体为Santa Cruz公司产品),最后化学发光法显带。

1.4 统计学处理

对蛋白免疫印迹及PCR产物电泳条带,采用Bio-Rad公司的Quantity one图像分析软件进行定量分析,采用SPSS统计软件进行t检验。

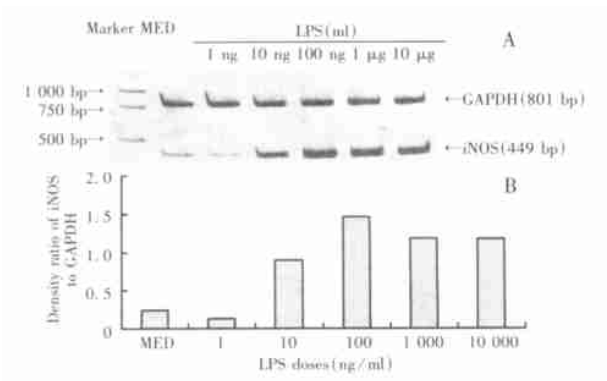
作者简介:苏踊跃(1971—),男,辽宁省锦州市人,硕士,医师,主要从事烧伤内毒素血症方面的研究。电话:(023)68754176
收稿日期:2001-11-05;修回日期:2002-02-27

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

2 结果

2.1 LPS 以剂量依赖性方式诱导 iNOS 表达

LPS 从 1 ng/ml 到 10 μg/ml 刺激 MPMs 6 h 的 RT-PCR 结果表明，从 10 ng/ml 起，iNOS 有表达，随剂量增加而增加，呈现出剂量依赖特点。在 100 ng/ml 时达到高峰，之后随剂量增加 iNOS mRNA 表达量变化不明显，见图 1A、B，表明选择 100 ng/ml 作为 LPS 工作浓度是合适的。



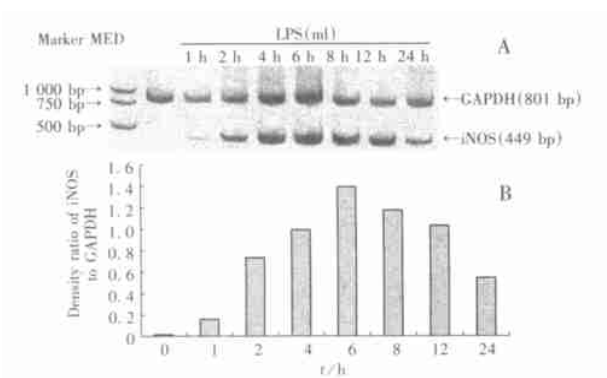
A: Various doses of LPS induced iNOS mRNA expressions; B: Intensities of bands analyzed with Quantity One scanning software

图 1 **LPS 诱导 iNOS mRNA 表达的量效关系**

Fig 1 Dose-effect relation of LPS and its induced iNOS mRNA expression in MPM

2.2 LPS 诱导 iNOS mRNA 表达的时效关系

LPS 100 ng/ml 刺激 MPMs，观察 iNOS mRNA 的诱导表达与 LPS 刺激时间的关系，重复实验结果显示在 2 h 可见 iNOS mRNA 表达轻度增加，4～8 h 表达明显增加，表达的高峰出现在 4～8 h，12 h 开始下降，见图 2。故后面实验中选取 LPS 刺激 6 h 时相点。



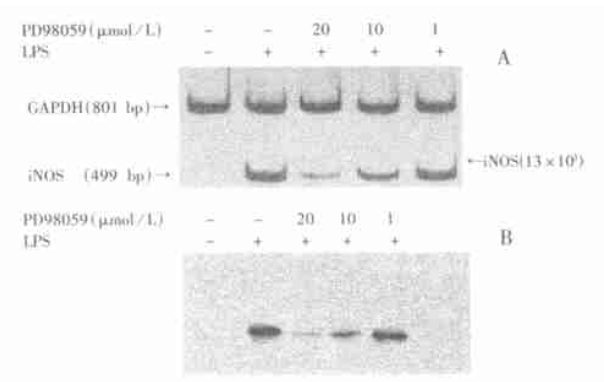
A: LPS induced iNOS mRNA expression at different time points; B: Intensities of bands analyzed with Quantity One software

图 2 **LPS 诱导巨噬细胞 iNOS mRNA 表达的时效关系**

Fig 2 Time-effect relation of LPS induced iNOS mRNA expression

2.3 ERK1/2 信号通路的特异性抑制剂对 iNOS mRNA 和蛋白表达的影响

3 次以上独立实验表明：以不同剂量的 ERK1/2 通路特异性抑制剂 PD98059 预处理巨噬细胞 1 h，能以剂量依赖性方式抑制 LPS 诱导的 iNOS mRNA 和蛋白表达，见图 3A、B。密度分析表明 PD98059 浓度为 20 μmol/L 时可抑制 84.1% 的 iNOS mRNA 表达，可抑制 90.21% 的 iNOS 蛋白表达。PD98059 浓度为 10 μmol/L 时相应的抑制率分别为 41.3% 和 64.67%。



A: RT-PCR; B: Western blotting

图 3 **PD98059 预处理对 LPS 诱导的 iNOS mRNA 和蛋白质表达的影响**

Fig 3 Effects of PD98059 pretreatment on LPS induced iNOS mRNA and protein expressions

3 讨论

NO 是巨噬细胞参与免疫调节和宿主防御反应的重要效应分子。巨噬细胞 NO 的产生主要受诱导型一氧化氮合酶（iNOS）调节，而 iNOS 表达调节的早期信号事件尚未清楚，在同一类细胞中，iNOS 的表达对同一信号通路的依赖程度也不尽相同，显示了其中信号事件的复杂性[5~7]。本实验探讨了 LPS 介导的小鼠腹腔巨噬细胞 iNOS 表达及 ERK1/2 信号通路在其中的作用。

我们选择小鼠腹腔原代巨噬细胞，首先进行 LPS 诱导 iNOS 表达的时效关系和量效关系研究。结果表明，LPS 能够诱导 C57BL/6J 小鼠腹腔巨噬细胞 iNOS 表达，并具有显著的时间和剂量依赖效应。LPS 单独刺激，在较小的剂量下即能够诱导 iNOS mRNA 的表达，表达高峰出现在刺激后 4～8 h，其后表达量有一逐渐下降的趋势。应用 ERK1/2 信号通路特异性的抑制剂 PD98059 进行预处理的研究中，我们发现 LPS 诱导的 iNOS 表达在 mRNA 和蛋白水平均不同程度地受到 PD98059 的抑制，提示在我们的实验体系中，LPS 诱导的 iNOS 表达部分依赖 ERK1/2 信号通路的调节。ERK1/2 信号分子是 MAPK 家族的主要成员之一，参与调节细胞骨架、细胞生长及分化等，是信号转导通路的中枢部分[1]。此前研究中，我们用抗 ERK1/2 磷酸化态的特异性抗体技术证明，小鼠腹腔巨噬细胞在 LPS 作用下，会迅速引起 ERK 磷酸化激活，活化的 ERK1/2，进一步引起转录因子活化，参与多种细胞因子（如 TNF-α，IL-1，IL-6，IL-12）基因表达的调控，这种激活能够被 PD98059 特异性抑制[8]。当然巨噬细胞 iNOS

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

表达的信号调节非常复杂,涉及多种信号通路以及各通路之间的对话(Crosstalk),ERK1/2 信号通路与其他信号通路有怎样的对话,ERK1/2 通过何种下游转录因子影响原代巨噬细胞 iNOS 的表达,这些都需要更进一步的研究。

LPS 作为 G-细菌的主要毒力成分,可以诱导宿主巨噬细胞 ERK1/2 信号通路的活化,进而介导 iNOS/NO 的产生,这对于病原微生物作用下宿主天然免疫反应的触发和调节具有重要的作用。

(致谢:本实验在中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所完成,衷心感谢张宗梁教授在实验过程中的指导!)

参考文献:

[1] Hunter T. Signaling-2000 and Beyond[J]. Cell, 2000, 100(1): 113—127.
[2] 苏踊跃, 王兴宇, 单佑安. 小鼠腹腔抑制性巨噬细胞免疫调变涉及 ERK1/2 和 p38MAPK 的激活与 NO 的生成[J]. 科学通报, 2001, 46(4): 313—317.
[3] Kang K W, Pak Y M, Kim N D. Diethylmaleate and buthionine sulfoximine, glutathione-depleting agents, differentially inhibit expression of inducible nitric oxide synthase in endotoxiemic mice[J]. Nitric Oxide, 1999, 3(3): 265—271.
[4] Bassam B J, Anolles G C, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. Anal Biochem, 1991, 196(1): 80—83.
[5] Feng G J, Goodridge H S, Harnett M M, *et al*. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase[J]. J Immunol, 1999, 163(12): 6 403—6 412.
[6] Caivano M. Role of MAP kinase cascades in inducing arginine transpoorters and nitric oxide synthetase in RAW264 macrophages[J]. FEBS Letters, 1998, 429(3): 249—253.
[7] Ajizian S J, English B K, Meals E A. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma[J]. J Infect Dis, 1999, 179(4): 939—944.
[8] 林明群, 张宗梁. 巨噬细胞免疫调变信号-PKA、PKC 对 MAPK 信号通路的调节[J]. 生物物理与生物化学学报, 1999, 31(6): 701—706.

(编辑 谢义霞)

文章编号: 1000-5404(2002)10-1207-01

个案与短篇

经鼻持续气道正压通气治疗阻塞型睡眠呼吸暂停综合征的疗效评估

Evaluation of the therapeutic effect of nasal continuous positive airway pressure on obstructive sleep apnea syndrome

路 菊, 王 璋 (第三军医大学附属西南医院老年病科, 重庆 400038)

阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(Obstructive sleep apnea syndrom, OSAS)是睡眠时因上气道阻塞引发阵发性呼吸暂停或通气不良的一种综合征。OSAS 是一种具有潜在危险的高发性疾病,由于睡眠时发生低氧血症及高碳酸血症,最终可导致心、脑、肺、内分泌功能紊乱等一系列并发症。应用经鼻持续气道正压通气(Nasal continuous positive airway pressure, nCPAP)能有效消除由于上气道阻塞引起的睡眠呼吸暂停和低通气呼吸,使低氧血症得以纠正,白天嗜睡等症状得以缓解,且无创、高效、可携机回家长期治疗,目前已成为治疗阻塞型睡眠呼吸暂停综合征(Obsructive sleep apnea syndrom, OSAS)的首选方法[1,2]。

1 资料与方法

1.1 一般资料

57 例夜间打鼾经多导睡眠图(Night Owl, Polywin 分析系统, USA)确诊的 OSAS 患者。男性 42 例,体重 70~100 kg,平均年龄(62.6±14.7)岁;女性 15 例,体重 55~65 kg,平均年龄(67.8±7.9)岁。所有患者均接受整夜 CPAP 治疗,时间 5~8 h,共计治疗 5~7 次。

1.2 方法

使用 DEVILB-AutoAdjust LT 8054 睡眠呼吸机,治疗时给患者戴上鼻面罩,让患者紧闭双唇,安静、平稳地用鼻腔呼吸。面罩要与鼻腔周围的皮肤密切接触,以免面罩内的空气逸漏。AutoAdjust 能根据患者有无呼吸暂停、低通气情况及上呼吸道阻力的大小等自动调整正压通气的压力。工作压力范围为 0.39~1.96 kPa。记录所有患者治疗前及治疗时的 PSG 资料,包括呼吸暂停和低通气指数(AHI)、阻塞型睡眠呼吸暂停(OSA)次数、平均呼吸暂停时间(OSAT)、全夜最低血氧饱和度($LSaO_2$)等参数,并通过询问患者及陪护人员了解患者治疗前和治疗时夜间鼾声及晨起后头痛、口干、白天乏力等临床表现。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

治疗前和治疗期间 PSG 参数的变化见表 1。经 CPAP 治疗后,所有患者鼾声消失,51 例(89.4%)白天乏力得到缓解,40 例有口干的患者 37 例(92.5%)症状消除,30 例有晨起头痛的患者 23 例(76.6%)症状缓解。43 例夜间尿频的患者 38 例

(下转 1210 页)

作者简介: 路 菊(1964—),女,安徽省安庆市人,主管护师。电话: (023)68754601

收稿日期: 2002-07-10; 修回日期: 2002-08-16

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