DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.06.015
第22卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 6
2000年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2000

文章编号:1000-5404(2000)06-0545-04

论著

山莨菪碱对核因子-κB活化的抑制作用

郭振辉,洪 新,毛宝龄,钱桂生,陈正堂 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察山莨菪碱(654-2)和脂多糖(LPS)共同处理单核细胞(M)后对核因子-κB抑制蛋白(IκB)降解和核因子-κB(NF-κB)活化的影响。方法 分离、培养M,分为正常对照组;LPS刺激组(LPS 10 μg/ml);654-2干预组(654-2 10 ng/ml预孵育1 h后加入LPS 10 μg/ml)。分别在刺激前(0)、刺激后0.25、0.5、1和2 h,留取M。检测M中IκBα水平和核提取物中NF-κB的活性。结果 LPS刺激组IκBα水平15 min开始降低,30 min降到最低值;NF-κB活性峰值显著高于刺激前和正常对照组($P<0.01$)。654-2干预后,IκBα水平最低值,显著高于LPS组($P<0.01$)而NF-κB活性虽较刺激前和正常对照组升高,但显著低于LPS组($P<0.01$)。结论 LPS可诱导M的IκBα降解和NF-κB激活,而654-2能减少IκBα降解,抑制NF-κB的活化。提示654-2在全身炎症反应综合症和急性肺损伤中可能具有治疗保护作用。

关键词:核因子-κB抑制蛋白;核因子-κB;山莨菪碱碱;急性肺损伤
中图法分类号:R392.11;R563 文献标识码:A

Effects of ansodamine on the activation of nuclear factor-kappa B *in vitro*

GUO Zhen-hui, HONG Xin, MAO Bao-ling, QIAN Gui-sheng, CHEN Zheng-tang (Research Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the effects of ansodamine (654-2) and Lipopolysaccharide (LPS) on the level of IκB and activation of nuclear factor-κB(NF-κB) in monocytes. Methods Monocytes collected from volenteers were cultured and divided into 3 groups. Group 1 was the normal control, group 2 consisted of monocytes stimulated with 10 μg/ml LPS and group 3 in which the monocytes were pretreated with 10 ng/ml ansodamine and stimulated with 10 μg/ml LPS. The level of IκB and the activity of NF-κB in the nuclear extract of the monocytes were examined before, 0.25, 0.5, 1 and 2 h after LPS stimulation. Results In group 2, the level of IκB began to decrease 0.25 h after LPS stimulation and reached the lowest point 0.5 h after. The peak activity of NF-κB was significantly higher than the pre-stimulational level and the level of the normal control ($P<0.01$). In group 3 with the pretreatment of ansodamine, the lowest level of IκB remained significantly higher than that of group 2 ($P<0.01$) and the activity of NF-κB was higher than that of the normal control but significantly lower than the activity of group 2 ($P<0.01$). Conclusion LPS can induce the degradation of IκB protein and the activation of NF-κB and ansodamine reduces the degradation of IκB protein and inhibits the activation of NF-κB. These facts suggest that ansodamine exerts therapeutic and protective effects on the human body against the challenge of inflammation reaction syndrome and acute lung injury.

Key words: nuclear factor kappa B inhibiting protein; nuclear factor kappa B; ansodamine; acute lung injury

急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)的本质是由一系列炎症因子或介质介导的过度炎症反应和炎症损伤。NF-κB的不适当激活是引起过度炎症反应和炎症损伤的关键因素[1]。致伤(炎)因子刺激效应细胞致NF-κB活化,NF-κB核易位后与其目的靶基因的启动子或增强子上特定的抑制蛋白(κB)序列结合,调控一系列参与炎症反应主要功能蛋白的表达而介导多种炎症性疾病的发生[2,3]。本所自80年代中期始应用山莨菪碱(654-2)于ALI防治取得良好效果[4],但其作用机制仍不清楚。为此,本研究拟通过LPS刺激单核细胞(M)

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(39730210)
作者简介:郭振辉(1962—),男,福建省晋江市人,博士,主治医师,主要从事急性肺损伤方面的研究,发表论文10篇,现在广州军区总医院呼吸内科,广州 510010。电话:(020)86699556
收稿日期:1999-07-12;修回日期:2000-02-08

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

后IκBα降解,NF-κB活化的关系及654-2对它们影响的研究以探讨654-2的抗炎机制及其为ALI等的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

LPS(大肠杆菌脂多糖 0_{111}:B_4)、阿斯匹林(ASA)(Sigma);poly(didc),T_4 多核苷酸激酶(宝灵曼);γ-^{32}PdATP(北京亚辉);兔抗人P65多克隆抗体,兔抗人IκBα(核因子-κB抑制蛋白α)多克隆抗体,HRP酶标抗体(Santa cruz,USA)。其它试剂为进口或国产分析纯。

含κB核心序列的双链寡核苷酸探针由上海细胞所合成,序列如下:

5′-AGCTTCAGAGGGGACTTTCCGAGAGG-3′

3′-AGTCTCCCCTGAAAGGCTCTCCAGCT-5′

1.2 主要器材

CO_2 培养箱(SHELDON,USA),垂直电泳槽、电泳仪、凝胶干燥仪,酶标分光光度计(美国BIO-RAD)。

1.3 实验方法

1.3.1 M分离与培养 健康献血员肝素化全血100 ml,分离单个核细胞,通过贴壁法获得粘附M,台盼蓝染色,计数判断细胞活力。将所得M接种于96孔培养板(1×10^5/孔),24孔培养板(5×10^6/孔)。分正常对照组(无刺激和干预因素);LPS刺激组(LPS 10 μg/ml);654-2干预组(654-2 10 ng/ml培养1 h后加LPS 10 μg/ml)。96孔板细胞经上述刺激后0、15、30、60、120 min预4%多聚甲醛(4%PFL)固定用以粘贴细胞ELISA测定。24孔培养板细胞经上述刺激30、60、120、240 min后留取细胞用以提取核蛋白。

1.3.2 粘贴细胞IκBα ELISA测定 本研究采用的粘贴细胞ELISA测定是利用M的粘贴特点,使其直接吸附于固相载体,而无需使用包被抗体吸附被测抗原。96孔板粘贴细胞共5个时相点,每个时相点设6孔复孔,经3%H_2O_2和0.3%曲拉通处理后,加兔抗人IκBα多克隆抗体(1∶200),同时对照组设一阴性对照;其后依次加HRP酶标抗体和底物浓液,15 min后滴终止液,测定$D_{490\ nm}$。结果判断以待测标本D_λ值/阴性对照D_λ值1.3.1或阴性对照D_λ值加2个标准差为阳性。

1.3.3 M核蛋白提取和κB序列的双链寡核苷酸探针的标记 参照Scheiber等[4]的方法。用碱性低渗裂解液A和B,分别裂解细胞及细胞核,低温高速离心(12 000 rpm),含核蛋白的上清液用Bradford法定其浓度,核蛋白-70°C冻存备用。

含κB序列的双链寡核苷酸探针P1,P2。在T4多核苷酸激酶段催化下,用γ-^{31}P-ATP标记探针5′端,纯化后测定探针的比放射性[6]。

1.3.4 M核提取物中NF-κB活性及特异性的检测 参照Shemkar等[7]的方法,用凝胶电泳迁移率改变(EMSA)法检测。①对照组,LPS刺激组,654-2干预组核提取物3 μg与标记探针2 μl(1 ngDNA);②LPS刺激核提取物3 μg然后分别加入100倍和200倍的未标记探针;③LPS刺激核提取物3 μg加兔抗人多克隆抗体14°C下预孵育1 h后,加入标记探针2 μl。上述混和物在结合缓冲液中充分结合后,进行6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳毕将凝胶置干燥仪中烤胶,-70°C放射自显影3 h。

1.4 统计学分析

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,对有关数据进行方差分析。

2 结果

2.1 M的分离、培养

每100 ml全血分离M总数约9.5×10^7,台盼蓝染色96%为活细胞。

2.2 各组LPS刺激前、后M核中NF-κB活性变化

LPS刺激组刺激后0.5~4 h NF-κB的活性显著增高($P<0.01$),峰值在刺激后1~2 h;654-2干预组NF-κB的活性显著低于单纯LSP刺激($P<0.01$),于刺激后1 h达峰值,见表1、图1。特异性抑制试验,未标记探针的浓度达标记探针的100倍时,竞争结合反应明显,表现为电泳滞后带变淡。达200倍时,滞后带逐渐消失,见图1;抗体超迁移试验,加入0.4 μg抗P^{50}多克隆抗体后,电泳滞后带变谈且更为滞后,见图1。

表1 LPS刺激及654-2干预后M中NF-κB活性改变

Tab 1 Alberation of NF-κB activity in mononuclear cells with LPS stimulated and 654-2 pretreatment

	A	B	C	D
NF-κB activity	53.4±1.3	32.4±0.9**	49.4±1.1	36.1±0.9**

A,C:1 h,2 h after LPS stimulation;B,D:1 h,2 h after LPS+654-2 treatment; **:$P<0.01$ *vs* LPS stimulation

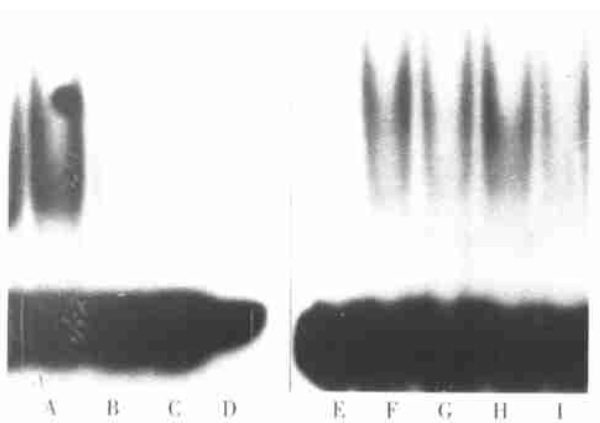


图1 NF-κB的特异竞争结合,LPS和654-2对NF-κB活性的影响

Fig 1 Specific combination of NF-κB, effects of LPS and 654-2 on the activity of NF-κB

A: LPS stimulation for 1 hour; B: LPS stimulation for 1 hour with addition of 100 times unmarked probe; C: LPS stimulation for 1 hour with addition of 200 times unmarked probe; D: NF-κB probe with addition of anti-p65 antibody; E: control group; F: LPS stimulation for 1 hour; G: LPS stimulation for 2 hours; I: LPS stimulation for 2 hours and 654-2 pretreatment

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

2.3　各组 LPS 刺激前、后不同时相点 MIκBα 相对含量的变化

因被测抗原含量与所测 D_λ 值的反对数值成正比, 故本研究采用 D_λ 值的反对数值表示 M 的 IκBα 相对含量。正常对照组各时相点 IκBα D_λ 值差异不显著; LPS 刺激前各组差异不显著; LPS 刺激组刺激后 15 min 显著降低($P<0.01$), 最低值在刺激后 30 min 为(0.93±0.13)ng/ml; 刺激后 30 min LPS 刺激组、654-2 干预组均显著低于正常对照组($P<0.01$), 但 654-2 预处理组均显著高于 LPS 刺激组($P<0.01$), 见表 2。

表 2　各组 LPS 刺激 654-2 预处理前、后不同时相点 M IκBα 相对含量的变化比较($n=6$)

Tab 2　Comparison of the contents of IκBα befor and at different time points of LPS stimulation and 654-2 pretreatment($n=6$)

Groups	Pretreatment	15 min	30 min	60 min	120 min
Control	1.84±0.31	1.82±0.06	1.84±0.06	1.84±0.08	1.81±0.05
LPS-stimulated	1.87±0.11	1.42±0.03 *#	1.11±0.04 **##	1.42±0.05 *#	1.86±0.03
654-2 treatment	1.81±0.02	1.48±0.06	1.29±0.06 **#★	1.5 ±0.09	1.79±0.02

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* pretreatment; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* control; ★: $P<0.05$ *vs* LPS-stimulation

3　讨论

既往研究表明: 654-2 具有的 M 受体拮抗作用, 同时具有拮抗钙内流和抗氧化作用[8]。晚近作者应用 654-2 干预 LPS 致伤 ALI 大鼠发现, 654-2 可显著抑制 LPS 致伤时 ALI 肺组织 TNFα、IL-8 mRNA 和蛋白表达, 提示 654-2 通过抑制促炎细胞因子 TNFα、IL-8 等表达而减轻肺组织的过度炎症反应和炎症损伤。由于促炎细胞因子等炎症效应蛋白表达主要受 NF-κB 调控, 因而推测 654-2 可能通过抑制 NF-κB 活化而发挥抗炎效应。本实验中, 采用 654-2 10 ng/ml 与 LPS 共同孵育, M 核蛋白中 NF-κB 活性显著低于单纯 LPS 刺激组, 结果表明治疗剂量的 654-2 可部分抑制 LPS 刺激 M 等炎症效应细胞所致的 NF-κB 活化, 减少 NF-κB 与炎症反应的目的基因启动子 κB 序列结合, 从而在基因转录水平抑制相应的基因表达。有关 654-2 抑制 NF-κB 活性下调相关基因表达的特异性有待进一步探讨。

LPS 刺激靶细胞通过细胞内信号转导, 激活 IκB 激酶(IKK), 使 IκB 磷酸化。IκB 的降解, 导致 NF-κB 活化, 从而在基因转录水平启动一系列细胞因子和炎症介质的基因表达。本实验中用 654-2 与 LPS 共同处理 M, IκB 的降解显著低于 LPS 刺激组, 提示 654-2 通过干扰靶细胞内信号转导途径, 抑制 IκB 的磷酸化, 阻断或延迟 IκB 的降解, 从而抑制 NF-κB 的活化。研究发现[8], 654-2 具有抗氧化剂特性, 而氧化剂参与细胞内信号转导。因此, 654-2 的抗氧化作用可能是其抑制 IκB 的降解重要环节。

NF-κB 二聚体的核易位并与特异性 κB 序列结合是其发挥调控作用的前提[9]。本实验中采用 γ-^{32}P-ATP 5′端标记通用 κB 系列(5′ ……TGGAATTCC ……—3′), 作为与 NF-κB 结合的探针。实验中的竞争抑制结果显示, 随着未标记 κB 系列探针浓度增加, 其滞后电泳带变淡乃至几近消失, 说明浓度远大于标记探针的未标记探针与 NF-κB 竞争结合, 由此证明 NF-κB 与 κB 系列结合的特异性。常规的 ELISA 方法是先将特异抗体包被在酶联板上, 之后将采集的样品按一定的容量加入酶联板中(抗原)再加入酶标抗体显色后比色其吸光度值的大小, 并设标准品进行定量分析。本实验由于 M 的粘贴特点, 使其直接吸附于固相载体, 而无需预先使用包被抗体吸附被测抗原。该方法对常规的 ELISA 进行了较大的修改, 但原理是相同的[10]。

综上所述, 654-2 可通过其固有的 M 受体拮抗作用及拮抗钙内流和抗氧化作用发挥 ALI 的防治作用。同时, 654-2 抑制致病因子刺激炎症效应细胞所致的 IκB 的降解, 从而抑制 NF-κB 活化, 在基因转录水平抑制 NF-κB 介导一系列细胞因子和炎症介质的基因表达, 阻断细胞因子和炎症介质的失控性释放, 对 SIRS/ALI 等炎症反应发挥一定的治疗作用。

参考文献:

[1] Baldwin A S Jr. The NF-κB and IκB protein: new discoveries and insights[J]. Annu Rev immunol, 1996, 14: 649—683.

[2] Barnes P J, Adcock I M. NF-κB: A pivotal role in asthma and a new target for therapy[J]. Trends-pharmacol-Sci, 1997, 18(2): 46—50.

[3] Rahman I, MacNee W. Role of transription factors in inflammatory lung diseases[J]. Thorax, 1998, 53(7): 601—612.

[4] 古国贤, 郭先健, 毛宝龄, 等. 犬注射油酸后的综合实验观察[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1985, 8(1): 1—6.

[5] Schreiber E, Matthias P, Miller M M, *et al*. Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts" prepared from a small number of cells[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(15): 6419.

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

[6] 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆—实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1996. 16—27.
[7] Shenkar R, Schwartz M D, Terada L S, *et al*. Hemorrhage activates NF-κB in murine lung mononuclear cells *in vivo*[J]. Am J Physiol, 1996, 270(5 Pt 1): L729—L735.
[8] 何 新. 山莨菪碱的药理作用及作用机制[J]. 数理医药学杂志, 1998, 11(3): 250—51.
[9] Bernard G R, Artigas A, Brigham K L, *et al*. Report of American-European consensus conference on ARDS: definition, mechanism, relevant outcomes and Clincical trial coordination[J]. Intensive Care Med, 1994, 20(3): 225—232.
[10] 毕爱华 主编. 医学免疫学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1995. 291—292.

(编辑 潘式文)

(上接544页)

DAB显色, 苏木精复染。切片需经微波炉抗原修复, 一抗1∶50稀释, 二、三抗1∶100稀释。用PBS代替一抗作阴性对照。

1.3 统计学处理

P-gp表达与临床病理的关系用χ^2检验, P-gp阳性组与阴性组生存率行Kaplan-meier曲线法分析并经Log-rank检验, $P<0.05$为相差显著。

2 结果

2.1 骨肉瘤P-gp表达

P-gp阳性产物为棕褐色细颗粒状, 主要定位于肿瘤细胞膜, 部分胞浆中亦可见阳性。阳性细胞呈局灶、散在或弥漫分布。80例骨肉瘤P-gp阳性表达者29例(36%)。

2.2 骨肉瘤P-gp表达与临床病理的关系

骨肉瘤P-gp表达经χ^2检验与骨肉瘤患者年龄、性别、肿瘤大小、Price's分级和Dahlin's分型无关($P>0.05$), 但与WHO新分型显著相关, 骨肉瘤骨内高分化型P-gp表达明显低于其它三种类型($P<0.05$)。

2.3 骨肉瘤P-gp表达与预后的关系

将80例骨肉瘤分为P-gp阳性组与阴性组, 分别绘制Kaplan-Meier生存曲线。P-gp阳性组2年生存率24.13%, 5年生存率为0; 阴性组2年生存率49.04%, 5年生存率为21.59%, 经Log-rank检验, 两组生存率相差显著($\chi^2=12.02$, $P<0.01$), P-gp阳性组生存率明显低于阴性组。

3 讨论

多药耐药性(MDR)的产生是肿瘤化疗失败的主要原因之一。自从1970年发现P-gp以来, 人们发现MDR与P-gp、谷胱甘肽S-转移酶(Glutathione stransferases, GST)、DNA拓扑酶Ⅱ(NDA TopoⅡ)等多种细胞内物质有关, 其中P-gp在肿瘤细胞中的高表达是肿瘤产生MDR的重要原因之一[1,2], 已引起广泛的关注。

P-gp是mdr1基因编码的一种能量依赖性转运蛋白, 位于细胞膜, 分子量为170× 10^3。研究表明P-gp在肾、肾上腺和胎盘等正常组织中高表达, 在脑、肺、肝、脾及结肠等中度表达[3], 并主要定位于一些具有分泌排泄功能的细胞, 故认为在正常组织中, P-gp起着对毒性化合物的清除作用[4]。在乳腺癌、肺癌、脑胶质细胞瘤、神经母细胞瘤等多种恶性肿瘤中P-gp均有表达, 并证实P-gp能与亲脂性抗肿瘤药物结合, 在ATP参与下将药物转运到细胞外, 使细胞内药物浓度下降, 而产生P-gp介导的MDR(即经典多药耐药性)[2]。

尽管通过术前化疗及术后辅助化疗的改进, 骨肉瘤患者生存率有所提高, 但5年生存率仍低于50%, 其中多药耐药性是重要原因之一。本文对80例骨肉瘤中P-gp的研究结果表明, P-gp表达者有29例(36%), 提示P-gp表达是骨肉瘤产生MDR的重要因素之一可部分解释骨肉瘤内在抗药性的原因, 并对指导制订化疗方案有一定临床应用价值。对P-gp阳性的骨肉瘤患者, 在化疗中加入抗药性调节剂(或称化学增敏剂), 通过竞争性地与P-gp的特殊位点结合, 抑制P-gp对抗肿瘤药物的转运, 使MDR得以逆转。

Baldini等[5]对92例高分化骨肉瘤的研究表明, 28例骨肉瘤P-gp高表达, P-gp高表达组生存率明显降低, 而P-gp表达与性别、年龄、坏死程度、组织学分型无关。本文对80例骨肉瘤P-gp的研究发现, 29例骨肉瘤有P-gp表达(36%)。P-gp阳性组2年生存率为24.13%, 5年生存率为0; 阴性组2年生存率为49.4%, 5年生存率为21.50%, 两者差异显著($\chi^2=12.02$, $P<0.01$), P-gp阳性组生存率明显低于阴性组, 这一结果提示P-gp可能成为骨肉瘤有价值的预后指标。P-gp表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、Price分级及Dahlin's分型无关($P>0.05$), 但与WHO新分型显著相关, 骨内高分化型骨肉瘤P-gp表达明显低于其它3种类型($P<0.05$), 这可能是骨内高分化型骨肉瘤预后较好的原因之一。总之, 骨肉瘤P-gp的表达是骨肉瘤MDR产生的主要原因之一, 并对患者化疗效果、预后的评估, 指导制定化疗方案有一定临床价值。

关键词: 骨肉瘤; P-糖蛋白; 预后; 多药耐药性
中图法分类号: R738.03 文献标识码: B

参考文献:

[1] Bradley G, Juranka P F, Ling V. Mechanisms of multidrug resistance[J]. Biochim Biophys, 1988, 948(1): 87—128.
[2] Gottesman M M, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter[J]. Annu Rev Biochem, 1993, 63(3): 385—427.
[3] 李 羲, 郭先健, 王 东, 等. P—糖蛋白在正常胎儿组织中的表达[J]. 第三军医大学学报, 1995, 17(6): 473—476.
[4] Kartner N. Cell surface P— glycoprotein in associated with multidrug resistance in mammalian lines[J]. Science, 1983, 221(6): 12 855—12 860.
[5] Baldini N, scotlandi K, Manara M. C, *et al*. Expression of P-glytoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome[J]. N Engl J Med, 1995, 333(3): 1 380—1 385.

(编辑 张大春)

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