

· 感染与免疫 ·

# 非受体型酪氨酸激酶 Tec 在内毒素/脂多糖诱导巨噬细胞促炎性细胞因子产生中的作用



王超 王飞 周波 邱乐 王健 刘晟 陈旭林

**【摘要】** **目的** 探讨非受体型酪氨酸激酶 Tec 在 LPS 诱导巨噬细胞产生 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  中的作用和相关机制。 **方法** 按随机数字表法将培养于 6 孔板的 RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞分为 4 组, 每组 24 孔。空白对照组细胞用含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养液常规培养 2 h; LFM-A13 组细胞先用 75  $\mu\text{mol/L}$  的 Tec 特异性抑制剂 LFM-A13 处理 1 h, 再同前常规培养 1 h; LPS 组细胞先同前常规培养 1 h, 再用 0.1  $\mu\text{g/mL}$  LPS 刺激 1 h; LPS + LFM-A13 组细胞先用 75  $\mu\text{mol/L}$  的 LFM-A13 处理 1 h, 再用 0.1  $\mu\text{g/mL}$  LPS 刺激 1 h。培养结束后, 采用 ELISA 法测定细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的含量, 实时荧光定量 RT-PCR 法检测细胞内 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 的表达, 蛋白质印迹法检测细胞内 Tec、转化生长因子激活激酶 1 (TAK1) 和 p38 MAPK 的活性。对数据行单因素方差分析、LSD 检验。 **结果** LFM-A13 组与空白对照组细胞培养上清液中的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量相近 ( $P$  值均大于 0.05), 2 组细胞内 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 表达量亦相近 ( $P$  值均大于 0.05)。LPS 组细胞培养上清液中的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量分别为  $(1\ 213 \pm 154)$ 、 $(636 \pm 90)$  pg/mL, 显著高于空白对照组的  $(330 \pm 44)$ 、 $(211 \pm 31)$  pg/mL ( $P$  值均小于 0.01); 其细胞内 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 表达量分别为  $1.57 \pm 0.22$ 、 $1.44 \pm 0.24$ , 显著高于空白对照组的  $1.00 \pm 0.18$ 、 $1.00 \pm 0.19$  ( $P$  值均小于 0.01)。LPS + LFM-A13 组细胞培养上清液中的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量分别为  $(787 \pm 109)$ 、 $(453 \pm 64)$  pg/mL, 显著低于 LPS 组 ( $P$  值均小于 0.05); 其细胞内 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 表达量分别为  $1.21 \pm 0.15$ 、 $1.21 \pm 0.22$ , 也显著低于 LPS 组 ( $P$  值均小于 0.05)。LFM-A13 组与空白对照组细胞内 Tec、TAK1 以及 p38 MAPK 活性相近 ( $P$  值均大于 0.05)。LPS 组细胞内 Tec、TAK1、p38 MAPK 活性分别为  $2.69 \pm 0.41$ 、 $3.99 \pm 0.65$ 、 $2.07 \pm 0.31$ , 明显高于空白对照组的  $1.00 \pm 0.17$ 、 $1.00 \pm 0.16$ 、 $1.00 \pm 0.18$  ( $P$  值均小于 0.01); LPS + LFM-A13 组细胞内 Tec、TAK1 和 p38 MAPK 活性分别为  $1.02 \pm 0.17$ 、 $1.18 \pm 0.20$ 、 $1.58 \pm 0.28$ , 较 LPS 组显著下降 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。 **结论** Tec 通过 TAK1—p38 MAPK 途径, 促进了 LPS 诱导巨噬细胞促炎性细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的产生和释放。

**【关键词】** 脂多糖类; 巨噬细胞; 细胞因子类; p38 丝裂原活化蛋白激酶类; Tec; 转化生长因子激活激酶

**Role of non-receptor tyrosine kinase Tec in the production of pro-inflammatory cytokines from macrophages induced by endotoxin/lipopolysaccharide** Wang Chao, Wang Fei, Zhou Bo, Qiu Le, Wang Jian, Liu Sheng, Chen Xulin. Department of Burns, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

Corresponding author: Chen Xulin, Email: okcxl@126.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the role of non-receptor tyrosine kinase Tec in the production of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  from macrophages induced by LPS and its related mechanism. **Methods** RAW 264.7 mononuclear-macrophages cultured in 6-well plates were divided into 4 groups according to the random number table, with 24 wells in each group. Cells in blank group were routinely cultured (cultured with DMEM medium containing 10% FBS) for 2 hours. Cells in LFM-A13 group were pretreated with 75  $\mu\text{mol/L}$  Tec specific inhibitor LFM-A13 for 1 hour and then routinely cultured for 1 hour. Cells in LPS group were routinely cultured for 1 hour and then treated with 0.1  $\mu\text{g/mL}$  LPS for 1 hour. Cells in LPS + LFM-A13

DOI:10.3760/ema.j.issn.1009-2587.2015.01.004

基金项目:国家自然科学基金(81000836,81372050)

作者单位:230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院烧伤科

通信作者:陈旭林,Email:okcxl@126.com

group were pretreated with 75  $\mu\text{mol/L}$  LFM-A13 for 1 hour and then treated with 0.1  $\mu\text{g/mL}$  LPS for 1 hour. The content of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in culture supernatant of cells was determined with ELISA. The mRNA expressions of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in cells were assayed with real-time fluorescent quantitative RT-PCR. The activity of intracellular Tec, p38 MAPK, and transforming growth factor activated kinase 1 (TAK1) was determined with Western blotting. Data were processed with one-way analysis of variance and LSD test. **Results** The content of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in culture supernatant of cells in LFM-A13 group was close to that in blank group (with  $P$  values above 0.05). The mRNA expressions of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the cells of LFM-A13 group were close to those of blank group (with  $P$  values above 0.05). The content of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in culture supernatant of cells in LPS group was respectively (1 213  $\pm$  154) and (636  $\pm$  90) pg/mL, which was higher than that in blank group [(330  $\pm$  44) and (211  $\pm$  31) pg/mL, with  $P$  values below 0.01]. The mRNA expressions of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the cells of LPS group were respectively 1.57  $\pm$  0.22 and 1.44  $\pm$  0.24, which were significantly higher than those of blank group (1.00  $\pm$  0.18 and 1.00  $\pm$  0.19, with  $P$  values below 0.01). The content of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in culture supernatant of cells in LPS + LFM-A13 group was respectively (787  $\pm$  109) and (453  $\pm$  64) pg/mL, which was significantly lower than that in LPS group (with  $P$  values below 0.05). The mRNA expressions of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the cells of LPS + LFM-A13 group were respectively 1.21  $\pm$  0.15 and 1.21  $\pm$  0.22, and they were significantly lower than those of LPS group (with  $P$  values below 0.05). The activity of intracellular Tec, TAK1, and p38 MAPK of cells in LPS + LFM-A13 group was close to that in blank group (with  $P$  values above 0.05). The activity of intracellular Tec, TAK1, and p38 MAPK of cells in LPS group was respectively 2.69  $\pm$  0.41, 3.99  $\pm$  0.65, and 2.07  $\pm$  0.31, which was significantly higher than that in blank group (1.00  $\pm$  0.17, 1.00  $\pm$  0.16, and 1.00  $\pm$  0.18, with  $P$  values below 0.01) and LPS + LFM-A13 group (1.02  $\pm$  0.17, 1.18  $\pm$  0.20, and 1.58  $\pm$  0.28,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusions** Tec promotes the production and release of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  from macrophages induced by LPS via TAK1 - p38 MAPK signaling pathway.

**【Key words】** Lipopolysaccharides; Macrophages; Cytokines; p38 mitogen-activated protein kinases; Tec; Transforming growth factor activated kinase

酪氨酸激酶是体内细胞信号转导的主要信号酶之一,它能催化多种底物蛋白质酪氨酸残基磷酸化,在细胞生长、增殖、分化中具有十分重要的作用。根据是否存在细胞膜受体,可将酪氨酸激酶分为受体型酪氨酸激酶和非受体型酪氨酸激酶两大类。受体型酪氨酸激酶位于细胞膜,其本身既是受体又是酶;非受体型酪氨酸激酶位于细胞质或细胞核,按其同源分为 Tec、Ab1、Ack 等 11 个家族<sup>[1]</sup>。非受体型酪氨酸激酶 Tec 是 1990 年从肝癌组织中筛选到的、起重要作用的一种酪氨酸激酶基因表达产物。近年来研究表明 Tec 参与一些炎症相关性疾病的发生<sup>[2]</sup>。本实验主要研究 Tec 对 LPS 诱导巨噬细胞产生促炎性细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的影响,并初步探讨其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及主要试剂与仪器来源

RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞源自 Abelson 鼠科白血病病毒诱导的肿瘤,购自中国科学院上海生命研究所。DMEM 培养基、FBS 购自美国 Gibco 公司,LPS(来源于大肠杆菌)购自美国 Sigma 公司,Tec 特异性抑制剂 LFM-A13 购自德国 Merck 公司,TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D 公司,总

RNA 提取试剂盒购自美国 MRC 公司,反转录及实时荧光定量 RT-PCR 试剂盒购自瑞士 Roche 公司,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 GAPDH 特异性片段扩增的寡核苷酸引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司,兔抗小鼠 Tec 单克隆抗体、兔抗小鼠磷酸化酪氨酸激酶单克隆抗体、兔抗小鼠磷酸化转化生长因子激活激酶 1(p-TAK1)单克隆抗体、兔抗小鼠  $\beta$  肌动蛋白单克隆抗体、兔抗小鼠 p38 MAPK 单克隆抗体和兔抗小鼠磷酸化 p38 MAPK(p-p38 MAPK)单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 均购自美国 CST 公司,化学发光试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。Epoch 型酶标仪购自美国 BioTek 公司,7500 型荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司,5200 型全自动化学发光成像分析系统购自上海天能科技有限公司,细胞培养箱购自美国 Thermo Scientific 公司。

### 1.2 细胞培养及分组

将 RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞接种于瓶底面积为 75  $\text{cm}^2$  培养瓶中,添加含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养液后,常规培养,隔日换液,待细胞铺满瓶底,即细胞密度约为每瓶  $2 \times 10^7$  个,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化,以每孔  $2.5 \times 10^6$  个接种于 6 孔板中,培养过夜。按照随机数字表法将细胞分为 4 组,每

组 24 孔。空白对照组细胞采用含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养液常规培养 2 h; LFM-A13 组细胞预先用 75  $\mu\text{mol/L}$  的 LFM-A13 处理 1 h, 再同前常规培养 1 h, LFM-A13 的使用剂量参照文献[3]; LPS 组细胞先同前常规培养 1 h, 再用 0.1  $\mu\text{g/mL}$  LPS 刺激 1 h; LPS + LFM-A13 组细胞预先用 75  $\mu\text{mol/L}$  的 LFM-A13 处理 1 h, 再用 0.1  $\mu\text{g/mL}$  LPS 刺激 1 h。

### 1.3 ELISA 法检测细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$ 以及 IL-1 $\beta$ 的含量

收集各组 8 孔细胞的培养上清液, 按照 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  ELISA 检测试剂盒说明书步骤操作, 采用酶标仪检测 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的含量。

### 1.4 实时荧光定量 RT-PCR 法检测细胞内 TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ mRNA 的表达

各组取 8 孔细胞, 加入 RNA 提取试剂, 提取总 RNA。取 1  $\mu\text{g}$  总 RNA 利用反转录试剂盒合成总互补 DNA, 反转录产物采用 SYBR Green 荧光定量试剂盒和荧光定量 PCR 仪行 PCR, 以 GAPDH 为内参照。引物序列经 Pubmed 查询后由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。TNF- $\alpha$  上游引物为 5'-ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3', 下游引物为 5'-ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3', 大小为 300 bp; IL-1 $\beta$  上游引物为 5'-CTCGGAGCCTGTAGTGCAG-3', 下游引物为 5'-GCAACTGTTCTGAACTCA-3', 大小为 382 bp; GAPDH 上游引物为 5'-AGCGAGACCCCACTAACA-3', 下游引物为 5'-GGGGCTAAGCAGTTGGTG-3', 大小为 263 bp。采用  $\Delta$  循环阈值(Ct)法处理结果, 计算细胞内 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 的相对表达量。

### 1.5 蛋白质印迹法检测细胞内 Tec、转化生长因子激活酶 1(TAK1)和 p38 MAPK 的活性

各组取 8 孔细胞, 加入约 100  $\mu\text{L}$  RIPA 裂解液, 冰上充分裂解 30 min, 转移至离心管中, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  下, 以离心半径 6 cm, 1 200 r/min 离心 20 min, 留取上清液。取总蛋白 50  $\mu\text{g}$ , 行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转膜, 50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h。Tris-吐温 20 缓冲液洗膜 3 次(每次 15 min), 根据蛋白相对分子质量剪膜后分别加入兔抗小鼠 Tec 单克隆抗体、兔抗小鼠 p-TAK1 单克隆抗体、兔抗小鼠 p38 MAPK 单克隆抗体、兔抗小鼠 p-p38 MAPK 单克隆抗体、兔抗小鼠  $\beta$  肌动蛋白单克隆抗体(稀释比均为 1:1 000), 4  $^{\circ}\text{C}$  振荡孵育过夜。加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 二抗(稀释比为 1:2 000), 室温振荡孵育 1 h。加入化学发光试剂, 化学发光成像

分析系统采集图像并进行灰度分析。另取总蛋白 50  $\mu\text{g}$ , 采用免疫沉淀法加入兔抗小鼠 Tec 单克隆抗体富集蛋白, 行电泳、转膜、封闭, 加入兔抗小鼠磷酸化酪氨酸激酶单克隆抗体, 行后续检测, 所得条带即为磷酸化 Tec 条带<sup>[2]</sup>。细胞内 Tec 活性以磷酸化 Tec 与 Tec 的灰度值比值表示, TAK1 活性以 p-TAK1 与  $\beta$  肌动蛋白的灰度值比值表示, p38 MAPK 活性以 p-p38 MAPK 与 p38 MAPK 的灰度值比值表示。

### 1.6 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 16.0 统计软件行单因素方差分析, LSD 检验(软件自动略去该统计量值),  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ 的含量

LFM-A13 组和空白对照组的细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量相近( $P$  值均大于 0.05); LPS 组细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  含量均显著高于空白对照组( $P$  值均小于 0.01); LPS + LFM-A13 组细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  含量均显著低于 LPS 组( $P$  值均小于 0.05), 但仍显著高于空白对照组( $P$  值均小于 0.05)。见表 1。

表 1 4 组巨噬细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的含量( $\text{pg/mL}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$
空白对照组	8	330 $\pm$ 44	211 $\pm$ 31
LFM-A13 组	8	329 $\pm$ 41	220 $\pm$ 27
LPS 组	8	1 213 $\pm$ 154 <sup>a</sup>	636 $\pm$ 90 <sup>a</sup>
LPS + LFM-A13 组	8	787 $\pm$ 109 <sup>bc</sup>	453 $\pm$ 64 <sup>bc</sup>
$F$ 值		139.378	95.895
$P$ 值		<0.01	<0.01

注:  $F$  值、 $P$  值为组间各指标总体比较所得; 与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 LPS 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

### 2.2 细胞内 TNF- $\alpha$ 及 IL-1 $\beta$ mRNA 的表达

LFM-A13 组和空白对照组细胞内的 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  mRNA 表达量相近( $P$  值均大于 0.05); LPS 组细胞内 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 表达量显著高于空白对照组( $P$  值均小于 0.01); LPS + LFM-A13 组细胞内 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 表达量显著低于 LPS 组( $P$  值均小于 0.05), 但仍显著高于空白对照组( $P$  值均小于 0.05)。见表 2。

### 2.3 细胞内 Tec、TAK1 和 p38 MAPK 的活性

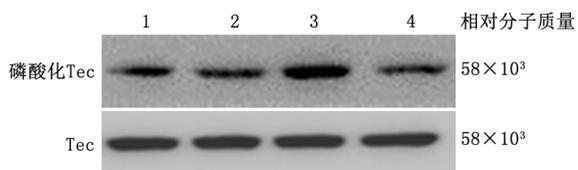
4 组细胞内 Tec、TAK1 以及 p38 MAPK 蛋白表达见图 1~3。LFM-A13 组和空白对照组细胞内 Tec、

表 2 4 组巨噬细胞内 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$
空白对照组	8	1.00 $\pm$ 0.18	1.00 $\pm$ 0.19
LFM-A13 组	8	0.92 $\pm$ 0.13	0.98 $\pm$ 0.13
LPS 组	8	1.57 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.44 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
LPS + LFM-A13 组	8	1.21 $\pm$ 0.15 <sup>bc</sup>	1.21 $\pm$ 0.22 <sup>bc</sup>
F 值		22.430	9.568
P 值		<0.01	<0.01

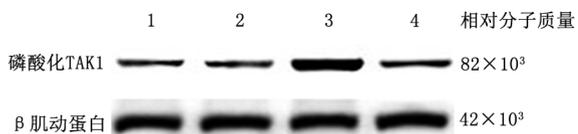
注: F 值、P 值为组间各指标总体比较所得;与空白对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.01, <sup>b</sup>P < 0.05;与 LPS 组比较, <sup>c</sup>P < 0.05

TAK1 和 p38 MAPK 活性相近(P 值均大于 0.05)。LPS 组细胞内 Tec、TAK1 和 p38 MAPK 活性分别是空白对照组的 2.69、3.99、2.07 倍(P 值均小于 0.01)。LPS + LFM-A13 组细胞内 Tec 活性较 LPS 组下降了 62.1% (P < 0.01), 与空白对照组接近(P > 0.05); 细胞内 TAK1 活性较 LPS 组下降了 70.4% (P < 0.01), 与空白对照组接近(P > 0.05); 细胞内 p38 MAPK 活性较 LPS 组下降了 23.7% (P < 0.05), 但仍显著高于空白对照组(P < 0.05)。见表 3。



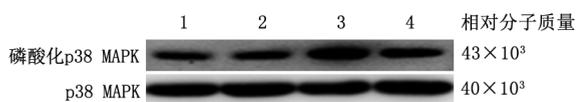
注: 1、2、3、4. 分别为空白对照组、LFM-A13 组、LPS 组、LPS + LFM-A13 组

图 1 蛋白质印迹法检测 4 组巨噬细胞内 Tec 的蛋白表达



注: 1、2、3、4. 分别为空白对照组、LFM-A13 组、LPS 组、LPS + LFM-A13 组

图 2 蛋白质印迹法检测 4 组巨噬细胞内转化生长因子激活酶 1(TAK1)的蛋白表达



注: 1、2、3、4. 分别为空白对照组、LFM-A13 组、LPS 组、LPS + LFM-A13 组

图 3 蛋白质印迹法检测 4 组巨噬细胞内 p38 MAPK 的蛋白表达

### 3 讨论

Tec 家族是近年来研究较多的与 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞增殖分化关系密切的一大类非受体酪

表 3 4 组巨噬细胞内 Tec、TAK1 和 p38 MAPK 活性 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	Tec	TAK1	p38 MAPK
空白对照组	8	1.00 $\pm$ 0.17	1.00 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.18
LFM-A13 组	8	0.98 $\pm$ 0.14	1.10 $\pm$ 0.18	1.05 $\pm$ 0.13
LPS 组	8	2.69 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	3.99 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	2.07 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>
LPS + LFM-A13 组	8	1.02 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	1.18 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	1.58 $\pm$ 0.28 <sup>cd</sup>
F 值		92.566	129.476	35.638
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注: F 值、P 值为组间各指标总体比较所得;TAK1 为转化生长因子激活酶 1;与空白对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.01, <sup>c</sup>P < 0.05;与 LPS 组比较, <sup>b</sup>P < 0.01, <sup>d</sup>P < 0.05

氨酸激酶,包括 Bruton 酪氨酸激酶、IL-2 酪氨酸激酶、骨髓 X 激酶、TXK 和 Tec<sup>[4]</sup>。它们在结构上具有高度同源性,是多种细胞因子、辅助分子以及受体酪氨酸激酶信号转导途径中的关键蛋白的重要靶分子,被激活后作用于下游底物使之磷酸化进行信号分子的传递,参与如生长因子受体、细胞因子受体、G 蛋白耦联受体、Toll 样受体等的信号转导<sup>[5]</sup>。Tec 在免疫和炎症反应中的作用近年来才刚刚得到认识。Wang 等<sup>[6]</sup>将 Tec 基因与 IL-8 启动子共转染至 RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞后观察到, Tec 可以通过活化细胞外信号调节激酶(ERK)从而明显增强 IL-8 基因的转录,编码 SH2、PH 或 PTK 结构域的 Tec 基因点突变能明显消除 Tec 蛋白对 IL-8 的促转录作用,IL-8 启动子与 Tec 的小干扰 RNA 共转染能够有效抑制 LPS 诱导人单核细胞白血病细胞产生 IL-8。

目前有关 Tec 特异性抑制剂的研究较少,最常用的抑制剂是 LFM-A13。Zemans 和 Arndt<sup>[3]</sup>研究表明,用 LPS 刺激人中性粒细胞时 Tec 活性升高,使用 LFM-A13 能明显抑制 TNF- $\alpha$  等细胞因子的释放。Susaki 等<sup>[7]</sup>研究表明, LFM-A13 能明显抑制人 T 淋巴细胞 Tec 的活化,并与 CD25 表达有关。本实验用 LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞后, Tec 显著活化,而加用 LFM-A13 能明显抑制 LPS 引起的 Tec 活化。这一结果再次证实了 LFM-A13 能抑制 Tec 活化。

细胞因子的产生和释放过程包括 mRNA 转录、前细胞因子的表达、炎症小体的组装、炎症小体和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 的激活等过程<sup>[8]</sup>。本研究结果显示, LFM-A13 对 LPS 刺激巨噬细胞后 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的产生和释放均有明显抑制作用,对细胞内 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 的表达亦有明显抑制作用。但它们的抑制幅度并不一致,其可能原因为促炎性细胞因子 mRNA 的表达结果并非直接定量,而

是经过  $\Delta Ct$  法二次运算得来的, 其他原因有待进一步研究。

TAK1 是 MAPK 激酶激酶家族成员, 可以激活 p38 MAPK、c-Jun 氨基末端激酶和 NF- $\kappa$ B 等通路。Shao 等<sup>[9]</sup>的研究显示, 一种新颖的萘酰亚胺衍生物 7b, 在 LPS 刺激的 RAW264.7 巨噬细胞中通过靶向抑制 TAK1, 下调 p38 MAPK 和 ERK1/2 介导的 NF- $\kappa$ B 活化, 表现出抗炎作用。Zhou 等<sup>[10]</sup>的研究显示, 幽门螺杆菌 LPS 通过上调 Toll 样受体 4 的表达, 刺激 TAK1 的磷酸化, 随后呈时间依赖性增强 p38 MAPK 磷酸化和 NF- $\kappa$ B 的活化, 促进 SGC-7901 细胞产生 IL-8。

p38 MAPK 属于 MAPK 家族中的应激活化蛋白激酶, 其活化使诱导型转录因子 (如激活蛋白 1 等) 活性上调, 致使大量下游炎症介质基因过度表达, 在全身炎症反应的发生发展中发挥重要调控作用。现已明确, p38 MAPK 是细胞内参与炎症反应的重要信号通路之一。

本研究结果显示, LPS 刺激后, 巨噬细胞 TAK1 被明显激活, 继而活化 p38 MAPK。Tec 的抑制剂 LFM-A13 能显著抑制 TAK1 和 p38 MAPK 的磷酸化, 同时抑制促炎性细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的产生和释放。上述结果表明, Tec 通过 TAK1—p38 MAPK 信号途径参与了 LPS 诱导巨噬细胞产生和释放促炎性细胞因子。然而 Tec 是如何引起该信号途径活化的, 目前尚未明确, 仍需进一步研究。

参考文献

[1] Page TH, Smolinska M, Gillespie J, et al. Tyrosine kinases and inflammatory signalling[J]. *Curr Mol Med*, 2009, 9(1):69-85.  
 [2] Horwood NJ, Urbaniak AM, Danks L. Tec family kinases in inflammation and disease[J]. *Int Rev Immunol*, 2012, 31(2):87-103.  
 [3] Zemans RL, Arndt PG. Tec kinases regulate actin assembly and cytokine expression in LPS-stimulated human neutrophils via JNK activation[J]. *Cell Immunol*, 2009, 258(1):90-97.  
 [4] Qiu L, Wang F, Liu S, et al. Current understanding of tyrosine kinase BMX in inflammation and its inhibitors [J]. *Burn Trauma*, 2014, 2(3):121-124.  
 [5] Boucheron N, Ellmeier W. The role of Tec family kinases in the regulation of T-helper-cell differentiation[J]. *Int Rev Immunol*, 2012, 31(2):133-154.  
 [6] Wang GQ, Yang XY, Jia YT, et al. Tec kinase mediating IL-8 transcription in monocytes stimulated with LPS[J]. *Inflammation*, 2009, 32(4):265-269.  
 [7] Susaki K, Kitanaka A, Dobashi H, et al. Tec protein tyrosine kinase inhibits CD25 expression in human T-lymphocyte [J]. *Immunol Lett*, 2010, 127(2):135-142.  
 [8] Novikov A, Cardone M, Thompson R, et al. Mycobacterium tuberculosis triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1 $\beta$  production in human macrophages[J]. *J Immunol*, 2011, 187(5):2540-2547.  
 [9] Shao J, Li Y, Wang Z, et al. 7b, a novel naphthalimide derivative, exhibited anti-inflammatory effects via targeted-inhibiting TAK1 following down-regulation of ERK1/2- and p38 MAPK-mediated activation of NF- $\kappa$ B in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(2):216-228.  
 [10] Zhou C, Ma FZ, Deng XJ, et al. Lactobacilli inhibit interleukin-8 production induced by Helicobacter pylori lipopolysaccharide-activated Toll-like receptor 4[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(32):5090-5095.

(收稿日期:2014-09-30)  
(本文编辑:莫恩)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊可直接使用英文缩写的常用词汇

已被公知公认的缩略语如 CT、DNA、HBsAg、Ig、PCR、RNA, 可不加注释直接使用。对本刊常用的以下词汇, 也允许直接使用英文缩写 (按首字母排序)。

脱细胞真皮基质 (ADM)	3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH)	一氧化氮合酶 (NOS)
丙氨酸转氨酶 (ALT)	血红蛋白 (Hb)	动脉血二氧化碳分压 (PaCO <sub>2</sub> )
急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)	苏木素-伊红 (HE)	动脉血氧分压 (PaO <sub>2</sub> )
天冬氨酸转氨酶 (AST)	重症监护病房 (ICU)	磷酸盐缓冲液 (PBS)
腺苷三磷酸 (ATP)	白细胞介素 (IL)	反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)
碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)	角质形成细胞 (KC)	全身炎症反应综合征 (SIRS)
集落形成单位 (CFU)	半数致死烧伤面积 (LA50)	超氧化物歧化酶 (SOD)
每分钟放射性荧光闪烁计数值 (cpm)	内毒素/脂多糖 (LPS)	动脉血氧饱和度 (SaO <sub>2</sub> )
细胞外基质 (ECM)	丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)	体表总面积 (TBSA)
表皮生长因子 (EGF)	最低抑菌浓度 (MIC)	转化生长因子 (TGF)
酶联免疫吸附测定 (ELISA)	多器官功能障碍综合征 (MODS)	辅助性 T 淋巴细胞 (Th)
成纤维细胞 (Fb)	多器官功能衰竭 (MOF)	肿瘤坏死因子 (TNF)
胎牛血清 (FBS)	核因子 $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)	负压封闭引流 (VSD)

本刊编辑部