

氯化镧对内毒素/脂多糖诱导巨噬细胞株一氧化氮合酶表达的抑制作用

娄远蕾 郭菲 汪泱 谢安 刘玉霞 李国辉



【摘要】 目的 了解氯化镧(LaCl₃)对内毒素/脂多糖(LPS)刺激的巨噬细胞诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达的影响,并探讨其机制。方法 将小鼠巨噬细胞株 RAW 264.7 分为空白对照组、LaCl₃组、LPS 组和 LaCl₃ + LPS 组。前 3 组细胞分别用常规培养液、含 2.5 μmol/L LaCl₃的培养液、含 1 mg/L LPS 的培养液培养 24 h,LaCl₃ + LPS 组用含 2.5 μmol/L LaCl₃的培养液培养 24 h 后,换为含 1 mg/L LPS 的培养液培养 24 h。采用免疫细胞化学染色法检测 iNOS 在各组细胞中的表达强度;蛋白质印迹法检测 iNOS 的蛋白表达水平;反转录-PCR 测定 iNOS 的 mRNA 表达水平;硝酸还原酶法测定各组细胞培养上清液中一氧化氮(NO)含量。结果 免疫细胞化学染色结果显示,iNOS 主要分布于各组细胞的胞质中,空白对照组和 LaCl₃ 组荧光强度极弱;LPS 组荧光强度最强,阳性细胞百分率为 44.4%,明显高于 LaCl₃ + LPS 组(11.8%, *P* < 0.05)。LPS 组 iNOS 蛋白及其 mRNA 表达量和细胞培养上清液中 NO 含量均高于其余各组(*P* < 0.05)。结论 LaCl₃ 可在 mRNA 水平和蛋白水平抑制 LPS 诱导的 iNOS 过度表达,减少 NO 生成,提示 LaCl₃ 能拮抗 LPS 诱导的 iNOS 过度活化。

【关键词】 镧; 内毒素类; 巨噬细胞; 一氧化氮合酶 II 型

Inhibitory effect of lanthanum chloride on the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide LOU Yuan-lei, GUO Fei, WANG Yang, XIE An, LIU Yuxia, LI Guo-hui. Institute of Urinary Surgery, the First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330006, P. R. China

Corresponding author: WANG Yang, Email: wangy63cn@sina.com, Tel: 0791-8692527

【Abstract】 Objective To explore the influence of lanthanum chloride(LaCl₃) on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW264.7 macrophages with lipopolysaccharide(LPS) induction, and to investigate its possible mechanisms. Methods The RAW264.7 macrophages were randomly divided into four groups: i. e. control group (without treatment), LaCl₃ group (with treatment of 2.5 μmol/L of LaCl₃ for 24 hrs), LaCl₃ + LPS group (with treatment of 2.5 μmol/L LaCl₃ for 24h), and LPS group (with treatment of 1mg/L LPS for 24 hrs). The iNOS protein expression was measured by immunofluorescence and Western blot. iNOS gene expression was assayed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). NO production in culture supernatant was assayed by nitrate reductase method. Results Immunofluorescence analysis showed that iNOS was located mainly in the cytoplasm. RAW264.7 cells with overexpression of iNOS accounted for 44.4%, which was obviously higher than that in LaCl₃ + LPS group (11.8%, *P* < 0.05). There was a faint signal of FITC-labeled green tint in control group or LaCl₃ group. The iNOS mRNA and protein expression, and the NO content in LPS group were significantly higher than those in control, LaCl₃, and LaCl₃ + LPS groups (*P* < 0.05). Conclusion LaCl₃ can suppress LPS-induced iNOS overexpression at mRNA and protein level and reduce NO production, indicating that LaCl₃ can antagonize the excessive activation of iNOS induced by LPS.

【Key words】 Lanthanum; Endotoxins; Macrophages; Nitric oxide synthase type II

内毒素性休克是严重烧伤患者的常见并发症和

主要死亡原因之一^[1]。诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的过度活化及其产物一氧化氮(NO)的大量生成,是其发病机制中的重要因素。寻找高效低毒的 iNOS 抑制剂对于内毒素血症的防治具有重要意义,也是广大学者一直关注的热点问题。镧是理化性质比较活跃的稀土元素,本研究小组前期研究已证实,氯化镧(LaCl₃)可通过结合内毒素/脂多糖

基金项目:国家自然科学基金(30660182);南昌大学创新团队建设计划

作者单位:330006 南昌大学第一附属医院泌尿外科(娄远蕾、汪泱、谢安、刘玉霞),烧伤科(郭菲、李国辉)

通讯作者:汪泱,Email: wangy63cn@sina.com,电话:0791-8692527

(LPS)降低 LPS 毒性,抑制内毒素血症小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及白细胞介素 1(IL-1)的分泌,对受致死量 LPS 攻击的小鼠具有保护作用^[2-5]。本研究中笔者进一步观察 LaCl₃对 LPS 诱导小鼠巨噬细胞株 iNOS 表达及 NO 分泌量的影响,旨在深入了解 LaCl₃拮抗 LPS 的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 主要试剂 LaCl₃·7H₂O(纯度为 99.9%)、LPS (*E. coli* O₅₅B₅)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔 IgG 均购自美国 Sigma 公司,兔抗鼠 iNOS 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司,DMEM/F12 培养液(LPS <0.03 U/ml)和胎牛血清(LPS <0.03 U/ml)购自美国 Invitrogen 公司,牛血清白蛋白为德国 Roche 公司产品。蛋白定量试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司,反转录(RT)-PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司,增强型化学发光试剂盒购自美国 Pierce 公司,NO 检测试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司,蛋白及 RNA 提取试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.2 主要仪器及器材 IX71 型荧光显微镜购自日本 Olympus 公司,蛋白电泳设备、半干转膜仪均为美国 Bio-Rad 公司产品,酶标仪购自芬兰 Lab-systems Multiscan Ascent 公司,PCR 扩增仪购自德国 Biometra 公司,DU 640 型核酸和蛋白分析仪购自美国 Beckman 公司,MGias-1000 型多媒体凝胶成像分析系统购自武汉千屏影像技术有限责任公司。实验所用玻璃器具和塑料器材均预先经灭菌、去热原、去 RNA 酶处理。

1.2 细胞培养及分组

1.2.1 细胞培养 小鼠巨噬细胞株 RAW 264.7 购自中国科学院上海细胞生物研究所。以 1×10^6 个/孔接种于培养瓶和预置有盖玻片的 24 孔培养板中,加入含体积分数 5% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液常规培养。

1.2.2 实验分组 取生长状态良好的细胞,按随机数字表分成 4 组,每组设 3 个复孔:空白对照组,不加任何刺激因素常规培养;LaCl₃组,用含 2.5 μ mol/L LaCl₃的培养液培养;LaCl₃+LPS 组,用含 2.5 μ mol/L LaCl₃的培养液培养 24 h 后,弃培养液,用等渗盐水漂洗细胞 3 次,再加入含 1 mg/L LPS 的培养液继续培养;LPS 组,用含 1 mg/L LPS 的培养

液培养。24 h 后收集各组细胞及其培养上清液进行下述检测。

1.3 免疫细胞化学检测

将长满细胞的盖玻片取出,以 30 g/L 多聚甲醛固定,体积分数 0.3% TritonX-100 透化处理,10 g/L 牛血清白蛋白 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min。加 1:100 稀释的兔抗小鼠 iNOS 多克隆 IgG 抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h;设不加一抗的细胞为阴性对照。磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 3 次后,加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG(1:100),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,漂洗后甘油封片。荧光显微镜下观察结果,任意选取多个视野,每视野计数 200 个细胞,计算阳性细胞百分率。

1.4 细胞总蛋白及总 RNA 的提取及鉴定

按试剂盒说明书提取细胞总蛋白及总 RNA。按蛋白定量试剂盒说明书测定蛋白浓度,在波长 260、280 nm 下测定吸光度值,计算两者比值以鉴定所提 mRNA 的纯度;琼脂糖凝胶电泳鉴定 mRNA 的完整性。

1.5 蛋白质印迹法检测 iNOS 的蛋白表达水平

取每组细胞的蛋白质各 30 μ g,经 75 g/L 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转膜,封闭。加入兔抗小鼠 iNOS 多克隆 IgG 抗体(1:200),室温孵育 2 h。洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体(1:2000),室温下孵育 1 h。洗膜,用增强型化学发光试剂盒检测杂交信号,通过凝胶成像分析系统对 iNOS 的蛋白表达水平进行半定量分析。

1.6 RT-PCR 测定 iNOS mRNA 表达水平

参照试剂盒说明书操作。分别取各组总 RNA 1 μ g 为模板合成 cDNA。引物由上海生工生物工程有限公司合成,iNOS 上游引物 5'-GTTTCTGGCAGCG-GCTC-3',下游引物 5'-GCTCCTCGCTCAAGTTCAGT-3';内参照 β 肌动蛋白的上、下游引物分别为:5'-CGTGGCCGCCCTAGGCACCAGGG-3', 5'-GGGAG-GAAGAGGATGCCGCACTGG-3'。取 4 μ l cDNA 为模板,加入上、下游引物各 1.5 μ mol/L,总反应体系为 20 μ l,以下列条件进行扩增:95 $^{\circ}$ C 变性 2 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,69 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,34 次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物经含 Gold-viewnal 型核酸染色液的 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像分析系统对结果进行半定量分析。

1.7 NO 含量的测定

取各组细胞的培养上清液,按试剂盒说明书以硝酸还原酶法检测 NO 含量。

1.8 统计学处理

部分数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析;率的比较采用卡方检验。

2 结果

2.1 免疫细胞化学检测结果

阴性对照细胞胞质荧光强度最弱,仅见模糊的片状细胞轮廓;空白对照组与 LaCl_3 组胞质荧光均微弱(图 1a、1b); $\text{LaCl}_3 + \text{LPS}$ 组阳性细胞百分率为 11.8%(图 1c);LPS 组胞质荧光明显强于以上各组,阳性细胞百分率达 44.4%($P < 0.05$,图 1d)。

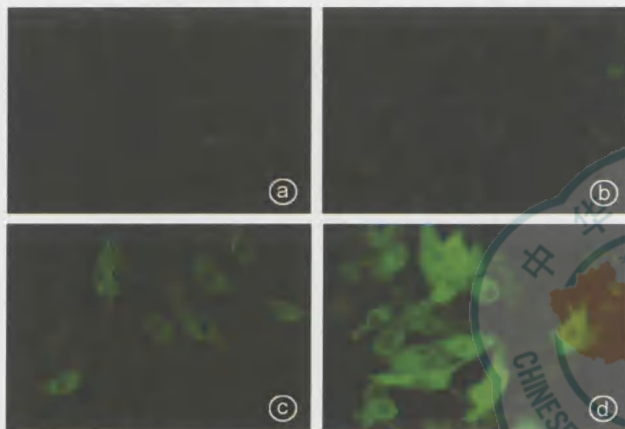


图 1 各组巨噬细胞胞质诱导型一氧化氮合酶的表达 异硫氰酸荧光素 $\times 100$ 。空白对照组(a)与氯化镧组(b)荧光均微弱;氯化镧 + 内毒素/脂多糖组(c)荧光较强;内毒素/脂多糖组(d)荧光明显强于其余各组

2.2 蛋白质印迹法检测结果

空白对照组和 LaCl_3 组条带模糊,iNOS 蛋白表达量分别为 0.27 ± 0.06 、 0.24 ± 0.07 ; $\text{LaCl}_3 + \text{LPS}$ 组蛋白表达量为 0.61 ± 0.07 ,高于空白对照组和 LaCl_3 组;LPS 组蛋白表达量为 1,明显高于其余各组($P < 0.05$)。见图 2。



图 2 蛋白质印迹法检测各组巨噬细胞诱导型一氧化氮合酶的蛋白表达水平。1. 空白对照组;2. 氯化镧组;3. 氯化镧 + 内毒素/脂多糖组;4. 内毒素/脂多糖组

2.3 RT-PCR 检测结果

空白对照组和 LaCl_3 组 iNOS mRNA 表达量为 0.019 ± 0.04 ,两组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$); $\text{LaCl}_3 + \text{LPS}$ 组 iNOS mRNA 表达量为 0.82 ± 0.07 ;LPS 组为 1.28 ± 0.22 ,明显高于其余各组($P < 0.05$)。见图 3。

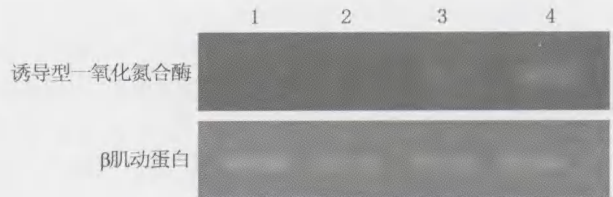


图 3 反转录-PCR 法检测各组巨噬细胞诱导型一氧化氮合酶的 mRNA 表达水平。1. 空白对照组;2. 氯化镧组;3. 氯化镧 + 内毒素/脂多糖组;4. 内毒素/脂多糖组

2.4 细胞培养上清液中 NO 的含量

LPS 组细胞培养上清液中 NO 含量为 $(52.8 \pm 12.6) \mu\text{mol/L}$,显著高于空白对照组 [$(2.9 \pm 2.4) \mu\text{mol/L}$] 和 LaCl_3 组 [$(6.5 \pm 4.7) \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$]; $\text{LaCl}_3 + \text{LPS}$ 组 NO 的含量为 $(26.0 \pm 5.8) \mu\text{mol/L}$,显著低于 LPS 组($P < 0.05$)。

3 讨论

NO 是介导烧伤后内毒素血症病理过程的关键炎性介质,它由一氧化氮合酶(NOS)催化 L-精氨酸而生成。哺乳动物体内有 3 种 NOS 亚型:神经型 NOS、内皮型 NOS 和 iNOS。其中前两者属低水平结构型表达,对维持机体正常的神经传递、血压调控及抑制血小板聚集等生理功能是必需的。iNOS 存在于几乎所有组织细胞的胞质和分泌小泡中,但主要来源于单核巨噬细胞^[6],正常生理情况下表达很低甚至不表达。当机体受到 LPS、双链 DNA 或 IL-1、TNF- α 及干扰素 γ 等致炎因子刺激时,组织细胞 iNOS 基因的表达迅速上调,从而促进 NO 的生成。NO 作为具有多种生理、病理功能的效应分子,对机体产生的不同影响取决于它的相对浓度。烧伤后由于受 LPS 等多种因素的刺激,细胞内 iNOS 活性增高,过量分泌 NO,造成细胞毒性及血流动力学改变,引起急性微循环障碍,组织器官低灌注,细胞发生能量代谢障碍,最终导致内毒素性休克和多器官功能衰竭^[7]。

镧属稀土元素,其毒性与铁接近^[8]。本研究小组在预实验中采用噻唑蓝法观察了 LaCl_3 对巨噬细胞活性的影响,结果表明 $0 \sim 400 \mu\text{mol/L}$ LaCl_3 无明显细胞毒性(数据略)。此外笔者还预先观察了不同浓度 LaCl_3 对 iNOS 表达的影响,结果表明, $2.5 \mu\text{mol/L}$ LaCl_3 即可明显抑制 LPS 诱导下 iNOS 的表达。本研究从 iNOS 的基因表达水平、蛋白表达水平及其 NO 产物水平,系统观察了 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 的 LaCl_3 对 LPS 诱导巨噬细胞 iNOS 表达的影响,结果

