

· 论著 ·

脂氧素 A4、保护素 D1、ResolvinD1 抑制多种激动剂引起的 NFκB 的活化

鲍华燕, 严君, 李珂, 刘鹏 (中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

[摘要] 目的 探讨脂质小分子脂氧素 A4 (LXA4)、保护素 D1 (ProD1)、ResolvinD1 (RvD1) 对核因子 κB (NFκB) 活性的影响及作用机制。方法 稳定表达 NFκB 荧光素酶报告基因的中国仓鼠卵巢细胞分别由 100 nmol/L LXA4、ProD1、RvD1 预处理 30 min 后, 细胞被激动剂 LPS、HSP70、HMGB1 或 S100A4 刺激。通过检测荧光素酶活性以评价脂质小分子对激动剂激活 NFκB 活性的作用。细胞培养上清中 TNFα 的含量由 ELISA 检测, 胞核中 NFκB 的含量由 Western 印迹检测。结果 LPS、HSP70、HMGB1 和 S100A4 显著上调 NFκB 的活性, 增加细胞分泌的 TNFα 的量。LXA4、ProD1、RvD1 显著抑制 NFκB 激活, 降低细胞分泌的 TNFα 含量, 减少 NFκB 的入核。结论 LXA4、ProD1、RvD1 显著抑制多种激动剂活化 NFκB, 其作用机制可能与其能降低 NFκB 的入核有关, 这几个脂质小分子在研制新型抗炎药物方面具有进一步开发和研究的潜力。

[关键词] 脂氧素 A4; 保护素 D1; resolvin; 核因子 κB; 炎症

[中图分类号] R657.51 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)03-0185-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.03.008

Stimulation of NFκB activity by the agonist inhibition from Lipoxin A4, Protectin D1 and Resolvin D1

BAO Hua-yan, YAN Jun, LI Ke, LIU Peng (Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective** To examine effect of lipoxin A4 (LXA4), protectin D1 (ProD1) or resolvin D1 (RvD1) on the activity of NFκB and their action mechanism. **Methods** The CHO cells, stably expressing NFκB luciferase reporter gene, were treated with LPS, HSP70, HMGB1 or S100A4, in the presence or absence of 100 nmol/L of LXA4, ProD1 or RvD1 for 30 minutes. The activity of NFκB was detected with the luciferase assay. The content of tumor necrosis factor α (TNFα) in supernatant was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the expression of NFκB in the nucleus was detected by immune blotting. **Results** The activity of NFκB and the level of TNFα in supernatant were significantly upregulated after treatment of the cells with LPS, HSP70, HMGB1 or S100A4, respectively. However, the NFκB activity and concentration of TNFα were lowered in the cells preincubated with LXA4, ProD1 or RvD1 as compared to the stimulated cells. Moreover, the lipids significantly decreased the content of NFκB in the nucleus. **Conclusion** LXA4, ProD1 or RvD1 could significantly inhibit the ligand-stimulated NFκB activity through interfering with NFκB translocation from cytoplasm to nucleus. LXA4, ProD1 and RvD1 showed the potential in the development of new anti-inflammatory therapeutics, which was required further research.

[Key words] lipoxin; protectin; resolvin; NFκB; inflammation

炎症是多种疾病发生发展的基本病理过程, 过度的炎症反应会造成机体自身组织的损伤。核因子 κB (nuclear factor-kappa B, NFκB) 是一类重要的核转录因子, 启动和调节多种免疫和炎症相关的基因转录^[1], 受 NFκB 调控的炎症蛋白包括 MCP-1、ICAM-1、TNFα 等^[2]。

热休克蛋白 (heat-shock protein, HSPs)、高迁移率族蛋白 (high-mobility group protein B, HMGB1)、S100 蛋白均可以刺激胞内炎症反应, 促进炎症因子释放^[3-5]。脂氧素、保护素、Resolvin 是近几年发现的一类对于炎症的转归具有重要调节作用的内源性脂质介质^[6,7]。本实验旨在研究 LXA4、ProD1 和 RvD1 对 NFκB 活性的影响, 为其在制备抗炎药物中的应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM 培养液、新生牛血清均购自美国 Gibco 公司, 胰酶和 LPS 均购自美国 Sigma 公司, Glo-

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目 (81030056); 国家自然科学基金面上项目 (30672468); 中央级公益性科研院所基本科研业务费 (2012CHX07)。

[作者简介] 鲍华燕 (1985-), 女, 博士研究生。Tel: (010)83161187, E-mail: baohuayan@sina.com。

[通讯作者] 刘鹏。Tel: (010)83465034, E-mail: liupeng@imm.ac.cn。

Max 96 微孔板发光检测仪和荧光素酶检测试剂盒均购自美国 Promega 公司, NFκB p65 抗体购自美国 Cell Signal Technology 公司, TNFα ELISA 试剂盒购自美国 eBioscience 公司, HSP70 购自加拿大 StressMarq 公司, HMGB1 购自美国 R&D 公司, S100A4 购于北京义翘神州生物技术有限公司, LXA4、ProD1 和 RvD1 均购自美国 Cayman 公司, 细胞核蛋白抽提试剂盒购自碧云天生物技术有限公司, BCA 蛋白定量试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司生产。

1.2 细胞培养 稳定表达 NFκB 荧光素酶报告基因的中国仓鼠卵巢细胞(CHO, 由本实验室构建)培养于 DMEM 培养液, 培养液中加入 10% 新生牛血清, 37 °C、5% CO₂。

1.3 细胞分组及处理 将生长良好的细胞用胰酶消化处理后, 显微镜下对细胞进行计数并计算细胞密度, 用细胞培养液稀释细胞悬液置于 96 孔板内, 控制细胞数量约为 1 × 10⁴ 个/孔, 置于细胞培养箱中约 24 h 待细胞贴壁后备用。

将细胞分为 3 大组: 空白对照组, 细胞培养板内单纯加入 DMEM 培养液; LXA4/ProD1/RvD1 + LPS/HSP70/HMGB1/S100A4 组, 细胞培养板内首先分别加入终浓度为 100 nmol /L 的 LXA4/ProD1/RvD1 预处理 CHO 细胞 30 min, 然后分别加入终浓度为 1 μg/ml 的 LPS/HSP70/HMGB1/S100A4 对细胞进行刺激; 单纯 LPS/HSP70/HMGB1/S100A4 组, 细胞培养板内与上组细胞同一时间分别加入终浓度为 1 μg/ml 的 LPS / HSP70 / HMGB1 / S100A4 刺激细胞。各组细胞经过相应处理 24 h 后, 测定细胞内 NFκB 活性以及上清中 TNFα 的含量。

1.4 测定细胞内 NFκB 活性 弃去细胞培养液, 用生理盐水将贴壁的 CHO 细胞清洗 2 次, 加入裂解缓冲液反应约 15 min, 向裂解产物中加入荧光素酶检测试剂, 严格按照荧光素酶检测试剂盒说明书操作, 使用 Glo-Max 96 微孔板发光检测仪评价细胞内 NFκB 活性。

1.5 ELISA 检测细胞培养上清中 TNFα 的含量 移液枪移取细胞培养上清液, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作测定上清液中 TNFα 的含量。

1.6 Western blot 分析胞核中 NFκB 的含量 用细胞刮子将各组细胞刮下, 严格按照细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒说明书操作, 提取胞核、胞浆蛋白。按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书对蛋白进行定量; 蛋白变性后, 经 SDS-PAGE 电泳, 用湿转法印记于 PVDF 膜; 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入抗 NFκB p65 抗体 4 °C 孵育过夜; 次日用 TBST 洗涤后加入相应的辣根酶标记的二抗, 室温孵育 1 h; 洗涤后显色。用 Western blot 印迹分析软件(Gelpro3.2) 计算各条

带光密度值, 分析蛋白表达情况。

1.7 统计分析 实验结果用均值 ± 标准误 (Mean ± SE) 表示。使用 SPSS 13.0 专业统计软件, 经参数或者非参数方差检验, 经比较 $P < 0.05$ 认为有统计学差异, $P < 0.01$ 认为有明显统计学差异。

2 结果

2.1 LPS/HSP70/HMGB1/S100A4 显著上调细胞 NFκB 活性 各组细胞分别经相应的处理后, 测定其 NFκB 的活性, 对照组细胞内 NFκB 的活性维持在较低的水平, 经 LPS / HSP70 / HMGB1 / S100A4 刺激后, 细胞内 NFκB 活性显著升高 ($P < 0.05$, 图 1)。但四种物质激活 NFκB 活性的强度不尽相同, 其中 LPS 的激活作用最强, HSP70 作用次之, HMGB1 和 S100A4 对 NFκB 活性的刺激作用相当。

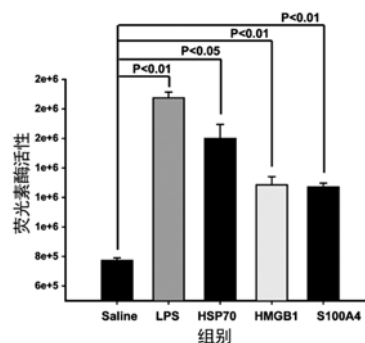


图 1 LPS、HSP70、HMGB1、S100A4 对细胞 NFκB 活性的影响

LPS/HSP70/HMGB1/S100A4 显著上调细胞 NFκB 活性, 独立实验重复 4 次。

2.2 LPS/HSP70/HMGB1/S100A4 显著增加胞外 TNFα 的含量 与对照组相比, 细胞经 LPS/HSP70/HMGB1/S100A4 处理后, 分泌到胞外的 TNFα 的量显著增加 ($P < 0.05$, 图 2)。四种物质中 LPS 刺激细胞分泌 TNFα 的作用最强, HMGB1 作用最弱, HSP70 和 S100A4 作用相当。

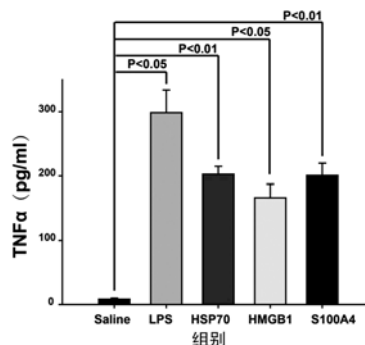


图 2 LPS、HSP70、HMGB1、S100A4 对细胞分泌 TNFα 的影响

LPS/HSP70/HMGB1/S100A4 显著增加胞外 TNFα 的含量, 独立实验重复 4 次。

2.3 LXA4/ProD1/RvD1 下调细胞 NFκB 活性 与单纯 LPS/HSP70/HMGB1/S100A4 刺激的细胞相比,加入 LXA4/ProD1/RvD1 预处理的细胞,其 NFκB 的活性显著被抑制($P < 0.05$,图 3),不同的物质对 NFκB 活性的抑制程度存在差异,与对照组相比,LXA4 抑制 NFκB 活化的作用最为显著($P < 0.01$)。

2.4 LXA4/ProD1/RvD1 显著减少胞外 TNFα 的含量 与单纯 LPS/HSP70/HMGB1/S100A4 刺激的细胞相比,加入 LXA4/ProD1/RvD1 预处理的细胞,分

泌到胞外的 TNFα 的量显著减少($P < 0.05$,图 4),但 LXA4、ProD1 或 RvD1 对 TNFα 分泌的抑制程度存在一定的差异。

2.5 LXA4/ProD1/RvD1 减少 NFκB 的入核 与单纯 LPS/HSP70/HMGB1/S100A4 刺激的细胞相比,加入 LXA4/ProD1/RvD1 预处理的大部分组别细胞,其核内 NFκB p65 的含量明显降低(图 5)。但其中,ProD1、RvD1 并不能抑制由 HMGB1 和 S100A4 引起的 NFκB 的入核。

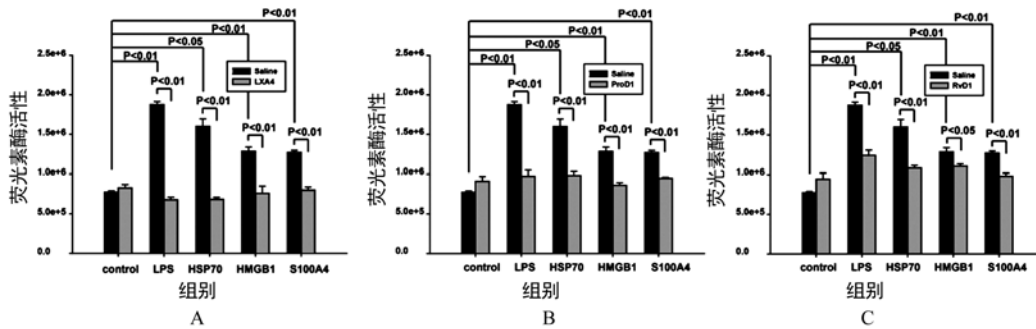


图 3 LXA4、ProD1、RvD1 显著抑制 NFκB 活性

A-LXA4 处理组;B-ProD1 处理组;C-RvD1 处理组,独立实验重复 4 次。

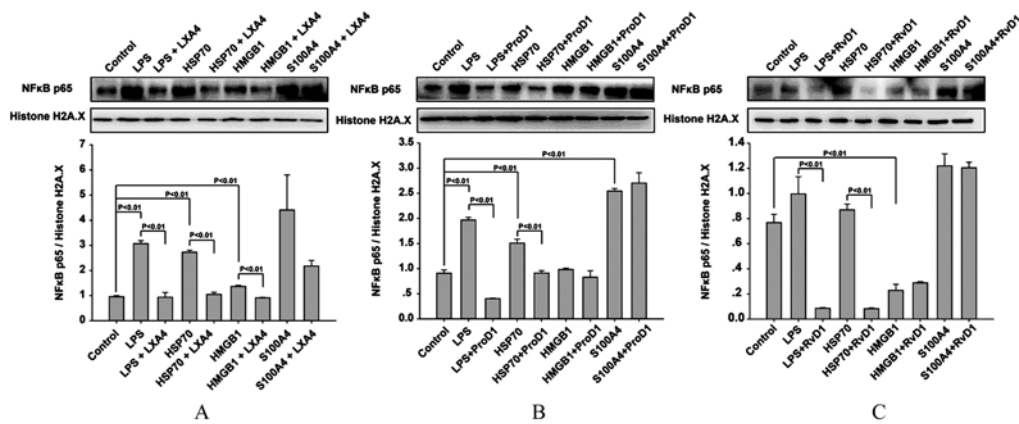


图 4 LXA4、ProD1、RvD1 显著减少上清中 TNFα 含量

A-LXA4 处理组;B-ProD1 处理组;C-RvD1 处理组,独立实验重复 4 次。

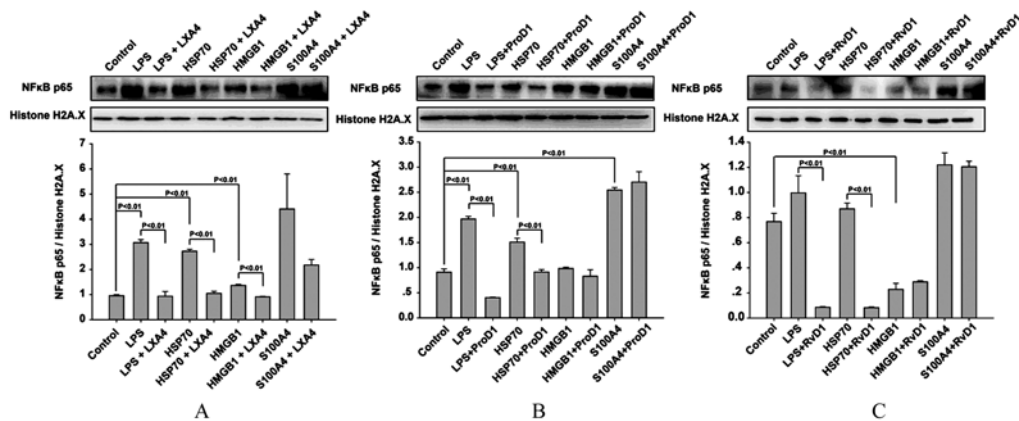


图 5 LXA4/ProD1/RvD1 对 NFκB 入核的影响

A-LXA4 处理组;B-ProD1 处理组;C-RvD1 处理组,独立实验重复 4 次。HT]

3 讨论

炎症是机体抵抗病原体入侵、修复组织细胞损伤的重要防御机制之一,若炎症反应持续维持在较高的水平会对机体造成损伤,甚至导致组织的纤维化。炎症的转归是指浸润在组织局部的白细胞及细胞碎片等被从炎症部位清除,使组织重新恢复稳态^[8]。炎症的转归并不是炎症反应的被动终止,而是一个主动的代谢过程^[9,10]。一些脂质小分子在炎症的转归过程中具有重要的作用,脂氧素、保护素、Resolvin 即是其中重要的一族,在机体内,它们主要由 ω -3 不饱和脂肪酸在 5-脂氧合酶、15-脂氧合酶等酶类的催化下经过跨细胞途径生成^[11-13]。

NF κ B 是一种与炎症反应密切相关的核转录因子,被 NF κ B 激活的细胞因子,如 IL-1 β 、TNF α 可以直接进一步引起 NF κ B 的活化,从而形成一个正调控增加炎症应答和延长慢性炎症的持续时间^[14]。本实验结果表明,用 LXA4、ProD1、RvD1 对细胞进行预处理,能够不同程度抑制胞内 NF κ B 的活性,减少分泌到胞外的 TNF α 的量,其对 NF κ B 活性的抑制作用与其抑制胞浆 NF κ B 的入核有关,这可能是这几个脂质介质具有促进炎症转归作用的重要原因之一。Wang 等人在 2011 年的研究发现^[15],脂氧素同系物 ATL 能够抑制胞浆 I κ B 的降解,阻断 NF κ B 的入核,抑制 NF κ B、AP-1 与 DNA 的结合,从而显著抑制 TNF α mRNA 的表达,其抑制作用接近 100%。本实验中,LXA4 抑制由 LPS、HSP70 引起的 NF κ B 活化的作用最为显著,LXA4 使细胞在 LPS、HSP70 刺激下的 NF κ B 活性降低到接近正常细胞水平,因此推测 LXA4 对 NF κ B 的激活具有强抑制作用的机制可能也与上述报道一致,这进一步说明 LXA4 等脂质小分子具有被进一步研究和开发的潜力。另外,本研究发现 LXA4、ProD1、RvD1 各自对细胞活化 NF κ B 和产生 TNF α 的抑制作用强度存在较大差异,造成这种差异的内在机制还有待更加深入的研究。

NF κ B 作为炎症反应中的一个重要的转录因子,从理论上说,如果能特异性地拮抗其活性,就可以起到高效的抗炎免疫效果。目前多种传统抗炎药,如糖皮质激素、阿司匹林、水杨酸钠等,就是通过多种途径抑制 NF κ B 等转录因子的活性,有效降低相关炎症介质的表达和释放。目前已有研究证明,LXA4、ProD1、RvD1 具有抗炎和促炎症转归的双重作用^[16],虽然这 3 种脂质介质发挥作用的具体分子机制和信号途径还需要进一步的深入研究,但是本实验为治疗一些炎性疾病提供了新的思路,对于研究开发新型的小分子抗炎药具有重要的参考价值。

【参考文献】

- [1] Shames BD, Selzman CH, Meng XZ, *et al.* Genes don't count [J]. Arch Surg, 1998, 133(6):667.
- [2] Nemeth ZH, Hasko G, Vizi ES. Phrrolidine dithiocarbamate augments IL-10, inhibits TNF- α , MIP-1 α , IL-12, and nitric oxide production and protects from the lethal effect of endotoxin [J]. Shock, 1998, 10(1):49.
- [3] Hamada N, Maeyama T, Kawaguchi T, *et al.* The role of high mobility group box 1 in pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 39:440.
- [4] Vabulas RM, Ahmad NP, Ghose S, *et al.* HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway [J]. J Biol Chem, 2002, 277:15107.
- [5] Foell D, Frosch M, Sorg C, *et al.* Phagocyte-specific calcinin-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation [J]. Clin Chim Acta, 2004, 34:37.
- [6] Canny G, Levy O, Furuta GT, *et al.* Lipid mediator-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia [C]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99:3902.
- [7] Campbell EL, Louis NA, Tomassetti SE. *et al.* Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution [J]. FASEB J, 2007, 21:3162.
- [8] Serhan, CN. A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution [J]. Histochem Cell Biol, 2004, 122:305.
- [9] Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, *et al.* Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins [J]. J Immunol, 2005, 174: 4345.
- [10] Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, *et al.* Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms [J]. FASEB J, 2007, 21:325.
- [11] Levy BD, Kohli P, Gotlinger K, *et al.* Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness [J]. J Immunol, 2007, 178:496.
- [12] Duffield JS, Hong S, Vaidya VS, *et al.* Resolvin, series and protectin D1 mitigate acute kidney injury [J]. J Immunol, 2006, 177:5902.
- [13] Mitchell, S, Thomas G, Harvey K, *et al.* Lipoxins, aspirin-triggered epi-lipoxins, lipoxin stable analogues, and the resolution of inflammation: stimulation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils *in vivo* [J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13:2497.
- [14] Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(4):1.
- [15] Wang YP, Wu Y, Li LY, *et al.* Aspirin-triggered lipoxin A4 attenuates LPS induced pro-inflammatory responses by inhibiting activation of NF κ B and MAPKs in BV-2 microglial cells [J]. J Neuroinflammation. 2011, 8: 95.
- [16] Serhan CN, Chiang N, Thomas E, *et al.* Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(5):349.

[收稿日期] 2012-03-23

[修回日期] 2012-05-07