

[文章编号] 1007- 3949(2000) - 02- 0099- 04

• 实验研究 •

巨噬细胞集落刺激因子对 RAW 264. 7 细胞谷胱甘肽过氧化物酶活性及其基因表达的影响

庞战军, 周 玫, 陈 媛

(第一军医大学生物化学与分子生物学研究所自由基医学研究室, 广东省广州市 510515)

[主题词] 巨噬细胞集落刺激因子; 谷胱甘肽过氧化物酶; 细胞系, RAW264. 7; 聚合酶链反应, 反转录; 氧化应激

[摘 要] 为探讨巨噬细胞集落刺激因子抗单核巨噬细胞氧化损伤的机理, 以富含巨噬细胞集落刺激因子的 L929 细胞条件培养基作为细胞因子来源, 采用酶活性测定、反转录聚合酶链反应等技术, 研究了巨噬细胞集落刺激因子对小鼠巨噬细胞系 RAW264. 7 细胞谷胱甘肽过氧化物酶活性及 mRNA 表达的影响。结果发现, 巨噬细胞集落刺激因子可以提高 RAW264. 7 细胞硒谷胱甘肽过氧化物酶及非硒谷胱甘肽过氧化物酶活性, 并增强 RAW264. 7 细胞血浆谷胱甘肽过氧化物酶 mRNA 的表达, 而对 RAW264. 7 细胞磷脂氢过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶的表达无诱导作用。

[中图分类号] Q554. 4

[文献标识码] A

Effect of Macrophage Colony- Stimulating Factor on Glutathione Peroxidase Activity and Gene Expression in RAW 264. 7 Cells

PANG Zhan- Jun, ZHOU Mei, and CHEN Yuan

(Research Laboratory of Free Radical Medicine, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

MeSH Macrophage Colony- Stimulating Factor; Glutathione Peroxidase; Cell Line, RAW264. 7; Polymerase Chain Reaction, Reverse Transcription; Oxidative Stress

ABSTRACT **Aim** In order to find out the mechanism that macrophage colony- stimulating factor protects monocytes/macrophages from oxidative injury. **Methods** We used macrophage colony- stimulating factor(MCSF) - riched L929 cell conditioned medium (L929- CM) to investigate the effect of MCSF on glutathione peroxidase (GPx) gene expression in RAW264. 7 cells applying enzyme activity determination and reverse transcription polymerase chain reaction (RT- PCR) technique. **Results** It showed that MCSF could improve selenium- dependent glutathione peroxidase (SeGPx) and non- selenium- dependent glutathione peroxidase (non- SeGPx) activity in RAW264. 7 cells. MCSF could also increase plasma glutathione peroxidase (PLGPx) mRNA expression in the cells. However, there was no induction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) expression by MCSF. **Conclusion** MCSF might protect monocytes / macrophages from oxidative injury through improving antioxidant enzymes activities and gene expression.

巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony - stimulating factor, MCSF) 是一种巨噬细胞特异性的生长因子, 在小鼠 L929 细胞系中呈高表达, L929 细胞条件培养基可用来进行有关 MCSF 的研究^[1]。以往的研究发现, MCSF 可以减轻叔丁基氢过氧化物对单核巨噬细胞的氧化损伤^[2, 3]。为探讨 MCSF 对单核巨噬细胞氧化损伤的保护作用是否与其对细胞抗

氧化酶的影响有关, 我们以 L929 细胞条件培养基作为 MCSF 来源, 研究了 MCSF 对小鼠巨噬细胞系 RAW264. 7 细胞谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx) 表达的影响。

1 材料与方法

1. 1 材料

RPMI- 1640 培养基、还原型谷胱甘肽、苯甲基磺酰氟、抑肽酶 (aprotinin)、枯烯过氧氢 (cumene hydroperoxide)、DNTB [5, 5' - dithiobis (2- nitrobenzoic acid)]、2- 巯基异丙醇、焦碳酸二乙酯 (diethyl pyro-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (编号 39670197)

[作者简介] 庞战军, 1973 年出生, 河南省偃师县人, 现为第一军医大学自由基医学研究室 97 级博士研究生, 主要从事有关自由基医学方面的研究。

carbonate, DEPC)、异硫氰酸胍、十二烷基肌氨酸钠(sarcosyl)、放线菌素 D(actinomycin D)、环己酰亚胺(cycloheximide)、加大麻素(acetovanilone)、dNTPs、RNase 抑制剂和矿物油等均购自 Sigma 公司; MMLV 逆转录酶、oligo (dT) 12- 18、无 RNase 的 DNase I 购自美国 Promega 公司; 根据 Genbank 小鼠 cDNA 序列, 采用 oligo 4. 0 引物设计软件设计 PCR 引物, 磷脂氢过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶(phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, PHGPx): 5' - GCA CGA ATT CTC AGC CAA GGA C- 3' 及 5' - CAC GCA GCC GTT CTT ATC AAT G- 3', 扩增片段大小为 406 bp; 血浆谷胱甘肽过氧化物酶(plasma glutathione peroxidase, PLGPx): 5' - ACG TAG CCA GCT ACT GAG GTC T- 3' 及 5' - CAT CTT GAC GTT GCT GAC TGT G- 3', 扩增片段大小为 425 bp; β - actin: 5' - GTG GGC CGC TCT AGG CAC CA- 3' 及 5' - CGG TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G- 3', 扩增片段为 245 bp。所用引物均由 GIBCO BRL 公司合成。小牛血清购自杭州四季青公司; 其它试剂均为分析纯。

1.2 L929 细胞条件培养基的收集与活性鉴定

L929 细胞采用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基在 5% CO₂、95% 湿润空气、37℃ 条件下培养, 待细胞生长至融合单层后, 换不含血清的 DMEM 培养基继续培养 5~ 7 天, 将培养基离心后吸取上清, 并过滤除菌, 即为 L929 细胞条件培养基。活性鉴定采用集落计数法^[4]: 取小鼠股骨骨髓细胞在含 30% 小牛血清、0. 45 mmol/L 还原型谷胱甘肽、0. 3% 琼脂和 20% L929 细胞条件培养基、髓细胞浓度为 10⁸ 个/L 的培养体系中培养 7 天(以 DMEM 培养基替换 L929 细胞条件培养基作为对照), 按超过 50 个细胞的细胞团为一个集落计数, 收集到的 L929 细胞条件培养基的平均活性约为 5 × 10⁵ CFU- GM/L。

1.3 细胞破碎与过氧化物酶活性测定

用细胞破碎液(50 mmol/L Tris- HCl, pH8. 0; 150 mmol/L NaCl; 0. 02% NaNO₃; 0. 1 g/L PMSF; 0. 001 g/L aprotinin; 1% Triton X- 100) 破碎细胞, 4℃ 放置 30 min, 将细胞裂解物转移至 Eppendorf 管中, 4℃ 10 000 g 离心 30 min, 吸取上清液用作酶活性及蛋白含量测定。谷胱甘肽过氧化物酶活性测定采用 DTNB 直接法^[5]。硒谷胱甘肽过氧化物酶(selenium- dependent glutathione peroxidase, SeGPx) 活性测定以 1. 5 mmol/L H₂O₂ 为底物, 总谷胱甘肽过氧化物酶(total glutathione peroxidase, TGPx) 活性测定以 9. 0 mmol/L 枯烯过氧氢为底物, 非硒谷胱甘肽过氧化物酶(non- selenium dependent glutathione peroxidase, non- SeG-

Px) 活性以 TGPx 与 SeGPx 活性测定值之差表示。用还原型谷胱甘肽作为标准, 以使还原型谷胱甘肽降低 1 μ mol 作为 1 个活性单位(u), 结果以每克蛋白质的酶活性单位数表示(u/g)。蛋白含量测定采用 Lowry's 法, 以酪蛋白为标准参照。

1.4 反转录聚合酶链反应

采用异硫氰酸胍- 酚- 氯仿一步法提取细胞总 RNA^[6]。向提取的 RNA 样品加入 1 u 无 RNase 的 DNase I, 室温下放置 2 h 以降解除去其中的基因组 DNA。再次纯化后, 用紫外分光光度法分别测定样品在 260 和 280 nm 波长上的光密度, 初步估算 RNA 的浓度与纯度。合成 cDNA 第一链: 向 0. 5 mL 离心管中分别加入 dNTPs (每种浓度为 10 mmol/L) 各 2 μ L; oligo (dT) 12- 18 (0. 1 g/L) 1 μ L; RNase 抑制剂 20 u; RNA (煮沸 5 min 并迅速置冰上冷却以使其变性) 2 μ g; 50 mmol/L MgCl₂ 1 μ L; 5 × PCR 缓冲液 4 μ L, 加 DEPC 处理水至总体积 20 μ L。加入 MMLV 反转录酶 100~ 200 u, 于 37℃ 反应 60 min。然后于 95℃ 加热 5 min, 以灭活反转录酶。取一新的 0. 5 mL 离心管, 依次加入 β - actin 及 PLGPx 或 PHGPx“上游”及“下游”引物(20 μ mol/L) 各 1 μ L, 4 种 dNTP 的混合液(每种浓度为 2. 5 mmol/L) 1 μ L, 5 × PCR 扩增缓冲液 4 μ L, 逆转录产物 2 μ L, 加水至 20 μ L。97℃ 变性 5 min, 冷却至 4℃。加 Taq DNA 聚合酶 1~ 2 u。加 20 μ L 轻矿物油覆盖于反应混合液上。设定聚合酶链反应参数(94℃ 30 s; 56℃ 45 s; 72℃ 60 s), 共 30 次循环。将产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下观察、摄影。

1.5 统计学处理

数据表示为均值 ± 标准差, 统计学分析采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 巨噬细胞集落刺激因子对谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响

将指数生长期的 RAW264. 7 细胞接种于含 1% 小牛血清的培养基中, 实验组给予 25% (V/V) L929 细胞条件培养基(MCSF) 处理, 对照组不给处理。24 h 后收集、破碎细胞, 测定 GPx 活性, 结果发现受 MCSF 作用的细胞 SeGPx 及 non- SeGPx 活性均比对照组高(表 1, Table 1)。

2.2 巨噬细胞集落刺激因子对血浆谷胱甘肽过氧化物酶表达的影响

将 RAW264. 7 细胞分为五组。对照组、MCSF 处

理组(培养体系中加 25% L929 细胞条件培养基)、MCSF+ 加大麻素组(25% L929 细胞条件培养基+ 0.05 g/L 加大麻素)、MCSF+ 放线菌素 D 组(25% L929 细胞条件培养基+ 0.005 g/L 放线菌素 D)和 MCSF+ 环己酰亚胺组(25% L929 细胞条件培养基+ 0.03 g/L 环己酰亚胺组)。细胞于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 6 h 后,收集细胞,提取总 RNA,采用反转录聚合酶链反应方法检测 PLGPx mRNA 的表达。结果显示,MCSF 处理组的细胞 PLGPx mRNA 表达较对照组细胞明显增高,而 MCSF 的这种诱导作用未被培养体系中加入的放线菌素 D、环己酰亚胺或加大麻素减弱(图 1, Figure 1)。

表 1. 巨噬细胞集落刺激因子对 RAW264.7 细胞谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响。

Table 1. Glutathione peroxidase activity($\times 10^3$ u/g) in RAW 264.7 cells treated with/without MCSF ($\bar{x} \pm s$).

GPx activity	TGPx	SeGPx	non- SeGPx
Control	30.71 \pm 2.85	14.85 \pm 5.17	15.86 \pm 3.15
MCSF	83.57 \pm 3.39 ^a	57.56 \pm 15.63 ^b	26.02 \pm 12.45 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with the control group.

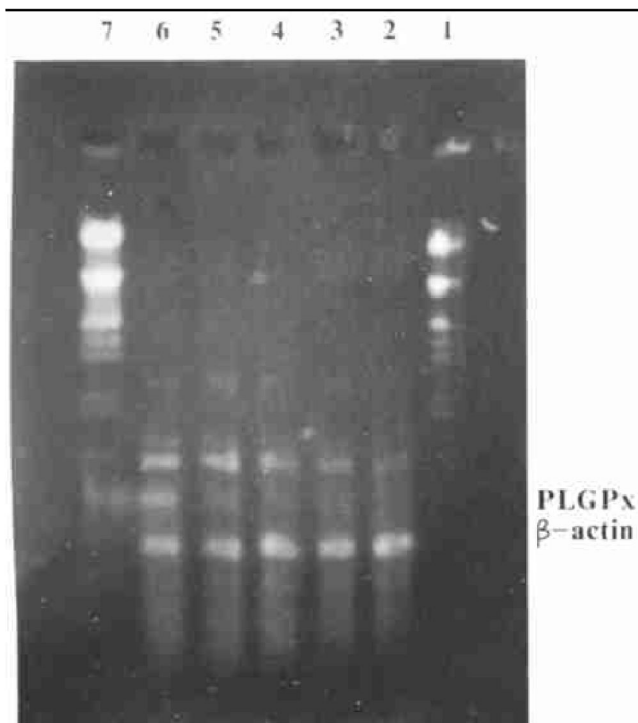


图 1. 巨噬细胞集落刺激因子对谷胱甘肽过氧化物酶 mRNA 表达的影响。

Figure 1. RT-PCR analysis: effect of MCSF on plasma glutathione peroxidase (PLGPx) mRNA expression in RAW264.7 cells. 1&7: λ DNA/EcoR iv+ Hind E ; 2: Control; 3: MCSF treated; 4: MCSF+ acetovanilone; 5: MCSF+ actinomycin D; 6: M- CSF+ cycloheximide.

2.3 巨噬细胞集落刺激因子对磷脂氢过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶表达的影响

RAW264.7 细胞分组与处理同上。结果显示, MCSF 对细胞 PHGPx mRNA 的表达无明显诱导作用(图 2, Figure 2)。

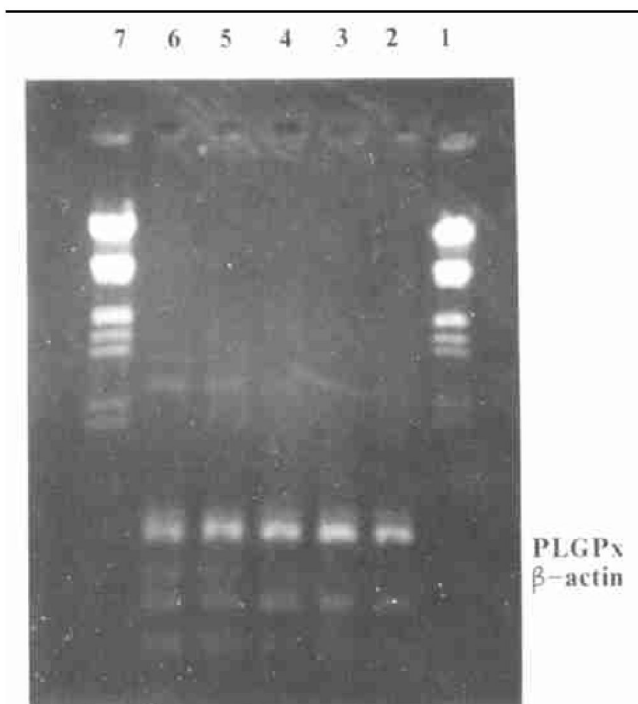


图 2. 巨噬细胞集落刺激因子对 RAW264.7 细胞磷脂氢过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶 mRNA 表达的影响。

Figure 2. RT-PCR analysis: effect of MCSF on phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA expression in RAW264.7 cells. 1&7: λ DNA/EcoR iv+ Hind E ; 2: Control; 3: MCSF treated; 4: MCSF+ acetovanilone; 5: MCSF+ actinomycin D; 6: M- CSF+ cycloheximide.

3 讨论

谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)家族是一个由绝大多数具有硒依赖性的酶组成的多基因家族,在清除细胞内过氧化物、保护细胞免受过氧化损伤过程中起重要作用。根据其活性是否依赖硒作为辅基,这些酶可大致分为硒谷胱甘肽过氧化物酶和非硒谷胱甘肽过氧化物酶。这两类谷胱甘肽过氧化物酶都利用还原型谷胱甘肽作还原剂,催化过氧化物的还原反应。其在催化活性上的区别在于谷胱甘肽过氧化物酶可以催化过氧化氢及其它有机过氧化物还原,而非硒谷胱甘肽过氧化物酶不能催化过氧化氢还原。在硒谷胱甘肽过氧化物酶类中包含两类重要的酶:磷脂氢过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶和血浆谷

胱甘肽过氧化物酶。前者位于细胞内,与细胞膜疏松结合,能够催化生物膜上磷脂氢过氧化物的还原^[7];后者可在细胞内合成后,经由细胞膜分泌至细胞外,在胞外起到还原、清除过氧化物的作用^[8]。

我们以前的研究发现,重组人巨噬细胞集落刺激因子或富含巨噬细胞集落刺激因子的 L929 细胞条件培养基可以减轻叔丁基氢过氧化物对单核巨噬细胞的氧化损伤,且这种保护作用可被抗巨噬细胞集落刺激因子的单克隆抗体所阻断,也说明 L929 细胞条件培养基中对单核巨噬细胞氧化损伤具有保护作用的成分主要是巨噬细胞集落刺激因子^[2]。而细胞抗氧化损伤的能力与其抗氧化酶的活性密不可分,因此我们以小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞为模型,进一步研究了巨噬细胞集落刺激因子对其谷胱甘肽过氧化物酶活性及 mRNA 表达的影响。结果表明:巨噬细胞集落刺激因子能提高 RAW264.7 细胞硒谷胱甘肽过氧化物酶与非硒谷胱甘肽过氧化物酶活性;巨噬细胞集落刺激因子可诱导 RAW264.7 细胞血浆谷胱甘肽过氧化物酶 mRNA 表达,且这一诱导作用未能被放线菌素 D 和环己酰亚胺阻断,可能的原因是,巨噬细胞集落刺激因子对血浆谷胱甘肽过氧化物酶表达的影响并非发生在转录水平;而巨噬细胞集落刺激因子对磷脂氢过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶的表达无影响。巨噬细胞集落刺激因子对谷胱甘肽过氧化物酶活性与表达的诱导,可能是巨噬细胞集落刺激因子防止 RAW264.7 细胞氧化损伤的原因之一。

近年来的研究认为,活性氧作为细胞内的一类传导信号参与了许多抗氧化酶类基因表达的调控,其作用原理是通过激活转录因子 NF- κ B。加大麻素可以特异性地抑制细胞内源性超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)

的产生^[9]。本研究发现,加大麻素不能阻断巨噬细胞集落刺激因子对血浆谷胱甘肽过氧化物酶 mRNA 表达的诱导,说明 $O_2^{\cdot-}$ 可能不是介导这一诱导过程的活性氧分子,其机理尚需进一步探讨。

参考文献

- [1] 朱宇,蔡海江,范乐明,等. mm-LDL 与 MCSF 对动脉壁细胞胆固醇酯蓄积的协同作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 1993, 1(1): 40-45
 - [2] Pang ZJ, Zhou M, Chen Y. Macrophage colony-stimulating factor protects mouse peritoneal macrophages from oxidative injury caused by tert-butyl hydroperoxide in vitro [J]. Med Sci Res, 1997, 25(12): 849-851
 - [3] Pang ZJ, Zhou M, Chen Y, et al. L929 cell conditional medium reduces the impairment in plasma membrane fluidity of U937 and J774 cell lines treated with tert-butyl hydroperoxide [J]. Med Sci Res, 1998, 26: 241-243
 - [4] 王洪斌,郑钦岳. 四种检测集落刺激因子方法的比较 [J]. 中华血液学杂志, 1991, 12(6): 323-324
 - [5] 夏奕明,朱莲珍. 血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法 [J]. 卫生研究, 1987, 16(4): 29-33
 - [6] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162: 156-159
 - [7] Nam S, Nakamura N, Kurohmaru M, et al. Cloning and sequencing of the mouse cDNA encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase [J]. Gene, 1997, 198: 245-249
 - [8] Maser RL, Magenheimer BS, Calvet JP. Mouse plasma glutathione peroxidase [J]. J Biol Chem, 1994, 269(43): 27 066-27 073
 - [9] Kimpe SD, Muijsers R, van Heuven Nolsen D, et al. Nitric oxide rather than peroxynitrite contributes to the loss of viability in macrophages after gram positive cell wall components [J]. Jpn J Pharmacol, 1997, 75(suppl 1): P-319
- (1999-09-20 收到, 2000-01-25 修回)
(此文编辑 朱雯霞)