

氧化剂对 RAW264.7 细胞诱导型一氧化氮合酶基因表达的影响

庞战军, 邢福祺, 陈欣¹

(第一军医大学南方医院妇产科, 广州 510515; 1. 衡阳市结核病医院)

[关键词] 一氧化氮合酶, 诱导型; 氧化应激; RAW264.7 细胞系; 基因表达

[摘要] 为揭示氧化应激对巨噬细胞诱导型一氧化氮合酶基因表达的影响, 采用逆转录多聚酶链反应技术, 观察氧化剂叔丁基氢过氧化物对 RAW264.7 细胞诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响。结果发现, 1.5×10^{-4} mol/L 叔丁基氢过氧化物能够诱导 RAW264.7 细胞诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达, 放线菌素 D、环己酰亚胺及 acetovanilone 均可减弱叔丁基氢过氧化物对 RAW264.7 细胞诱导型一氧化氮合酶表达的诱导。另外, 叔丁基氢过氧化物对 RAW264.7 细胞诱导型一氧化氮合酶表达的诱导作用还可被核因子- κ B 抑制剂 PDTDC 减弱。可见, 氧化剂可诱导 RAW264.7 细胞诱导型一氧化氮合酶 mRNA 的表达, 且作用在转录水平, 该过程中有新的蛋白质合成及内源性活性氧产生的参与, 转录因子核因子- κ B 的激活也可能与该诱导过程有关。

[中图分类号] R392

[文献标识码] A

Effect of Oxidant on Inductive Nitric Oxide Synthase mRNA Expression in RAW264.7 Cells

PANG Zharr-Jun, XING Fu-Qi, and CHEN Xin

(Department of Obstetrics and Gynecology, Nanfang Hospital, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

MeSH Inductive Nitric Oxide Synthase; Oxidative Stress; RAW264.7 Cell Line; Gene Expression

ABSTRACT **Aim** To check the effect of oxidative stress on inductive nitric oxide synthase (iNOS) mRNA expression in macrophages. **Methods** The effect of tert-butyl hydroperoxide (tbOOH) on iNOS mRNA expression in RAW264.7 cells was investigated by RT-PCR method. **Results** It showed that, 1.5×10^{-4} mol/L tbOOH could induce iNOS mRNA expression in RAW264.7 cells; and the induction could be attenuated by actinomycin D or cycloheximide or acetovanilone added in the medium. Transcription factor NF- κ B specific inhibitor PTDC could also reduce the induction. **Conclusions** It indicated that, tbOOH could transcriptionally induce iNOS expression in RAW264.7 cells, de novo protein synthesis and intracellular superoxide ($O_2^- \cdot$) production might be involved in the process. The activation of NF- κ B was also one part of the process.

诱导型一氧化氮合酶(inductive nitric oxide synthetase, iNOS)是存在于巨噬细胞中的特异性一氧化氮合酶, 巨噬细胞产生一氧化氮就是通过其催化底物 L- 精氨酸完成的。在机体生理环境中, 巨噬细胞经常受到活性氧自由基的攻击而处于氧化应激状态。为探讨氧化应激对巨噬细胞生物学功能的调节, 我们以小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 为研究对象, 研究了氧化剂叔丁基氢过氧化物(tert-butyl hydroperoxide, tbOOH)对其 iNOS 表达的影响。

1 材料与方

[作者简介] 庞战军, 男, 1973 年出生, 河南偃师人, 医学博士, 助理研究员, 现从事生殖健康及自由基医学方面的研究。

1.1 材料

RPMI1640 培养基、叔丁基氢过氧化物 (tbOOH)、2-巯基异丙醇、焦碳酸二乙酯 (DEPC, diethyl pyrocarbonate)、异硫氰酸胍、Sarcosyl、放线菌素 D (actinomycin D)、环己酰亚胺 (cycloheximide)、acetovanilone、PDTDC (pyrrolidinedithiocarbamate)、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 和无 RNase 的 DNase I 购自美国 Promega 公司。根据 Genebank 小鼠 cDNA 序列, 采用 OLIGO 4.0 引物设计软件设计 PCR 引物, iNOS: 5'-TGA TGT GCT GCC TCT GGT CTT G-3' (正义) 及 5'-TGT GTG GTG GTC CAT GAT GGT C-3' (反义), 扩增片段大小为 409 bp; β

actin: 5'-GTG GGC CGC TCT AGG CAC CA-3' (正义) 及 5'-CGG TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G-3' (反义), 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 细胞培养及处理

取指数生长期的 RAW264.7 细胞, 分为 5 组, 分别为: 对照组(无任何处理); tbOOH 处理组(1.5×10^{-4} mol/L tbOOH 处理); acetovanilone 组(1.5×10^{-4} mol/L tbOOH + 50 mg/L acetovanilone); 放线菌素 D 组(1.5×10^{-4} mol/L tbOOH + 5 mg/L 放线菌素 D); 环己酰亚胺组(1.5×10^{-4} mol/L tbOOH + 30 mg/L 环己酰亚胺), 培养 6 h 后采用 RT-PCR 方法检测 iNOS mRNA 含量。在另外的实验中, 用核因子- κ B 特异性抑制剂 100 μ g/L PDTC 预先处理细胞 24 h, 再加入 1.5×10^{-4} mol/L tbOOH, 余下步骤同上。

1.3 总 RNA 提取

采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法^[1]。离心收集细胞, 按 1 mL/管加入变性液(4 mol/L 异硫氰酸胍; 25 mmol/L 柠檬酸钠, pH7; 0.5% Sarcosyl; 0.1 mol/L 2-巯基乙醇), 反复吹打使细胞裂解。依次加入 0.1 mL 2 mol/L NaAc (pH4), 1 mL 酚(水饱和), 0.2 mL 氯仿-异戊醇(49:1), 强烈振荡 10 s, 冰浴 15 min 后, 4℃ 10 000 g 离心 20 min。小心吸取水相, 转移至另一离心管中, 加 1 mL 异丙醇, 置 -20℃ 过夜沉淀 RNA。4℃ 10 000 g 离心 20 min。RNA 沉淀溶于 0.3 mL 变性液, 移至 1.5 mL Eppendorf 管, 加 1

体积的异丙醇沉淀(-20℃, 1 h)。4℃ 离心 10 min, RNA 沉淀用 75% 的乙醇悬浮, 真空干燥 15 min, 用 50 μ L DEPC 处理水溶解。

1.4 逆转录-多聚酶链反应

按文献[2]报道的方法。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。酚-氯仿再次纯化后, 用 MMLV 逆转录酶合成 cDNA 第一链, 然后于 95℃ 加热 5 min 以灭活逆转录酶。取一新的 0.5 mL 离心管, 依次加入 β -actin 及 iNOS“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 \times PCR 扩增缓冲液 4 μ L 和逆转录产物 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。吸取 20 μ L 矿物油覆盖于反应混合液上。设定 PCR 反应参数(94℃ 30 s; 58℃ 45 s; 72℃ 60 s), 循环 30 次。将产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下观察并摄影。

2 结果

2.1 tbOOH 诱导 RAW264.7 细胞诱导型一氧化氮合酶表达增加

从图 1 (Figure 1) 可见, 正常情况下 RAW264.7 细胞 iNOS 的表达量很低。在 tbOOH 作用 6 h 后, RAW264.7 细胞 iNOS mRNA 表达增加。氧化剂 tbOOH 对 RAW264.7 细胞 iNOS 表达的诱导可被加在反应体系中的 30 mg/L 环己酰亚胺或 50 mg/L acetovanilone 或 5 mg/L 放线菌素 D 所减弱。

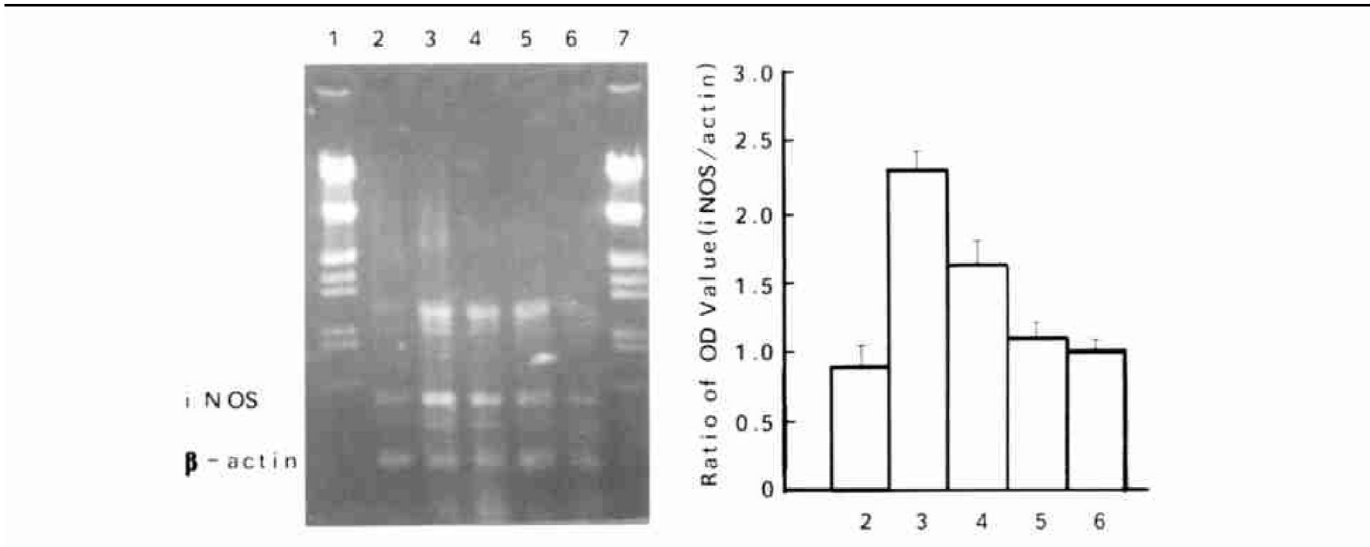


图 1. tbOOH 对 RAW264.7 细胞诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响

Figure 1. RT-PCR analysis: effect of tbOOH on inductive nitric oxide synthase mRNA expression in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$).

1&7: λ DNA/EcoR I+ Hind III; 2: Control; 3: 1.5×10^{-4} mol/L tbOOH treated; 4: tbOOH + cycloheximide; 5: tbOOH + actinomycin D; 6: tbOOH + acetovanilone. *: $P < 0.05$, compared with the optical density of other lanes.

2.2 PDTC 对 tBOOH 诱导 RAW264.7 细胞诱导型一氧化氮合酶表达的影响

图 2(Figure 2) 显示, tBOOH 对 RAW264.7 细胞 iNOS 表达的诱导作用可被 100 $\mu\text{g/L}$ 的 PDTC 抑制。

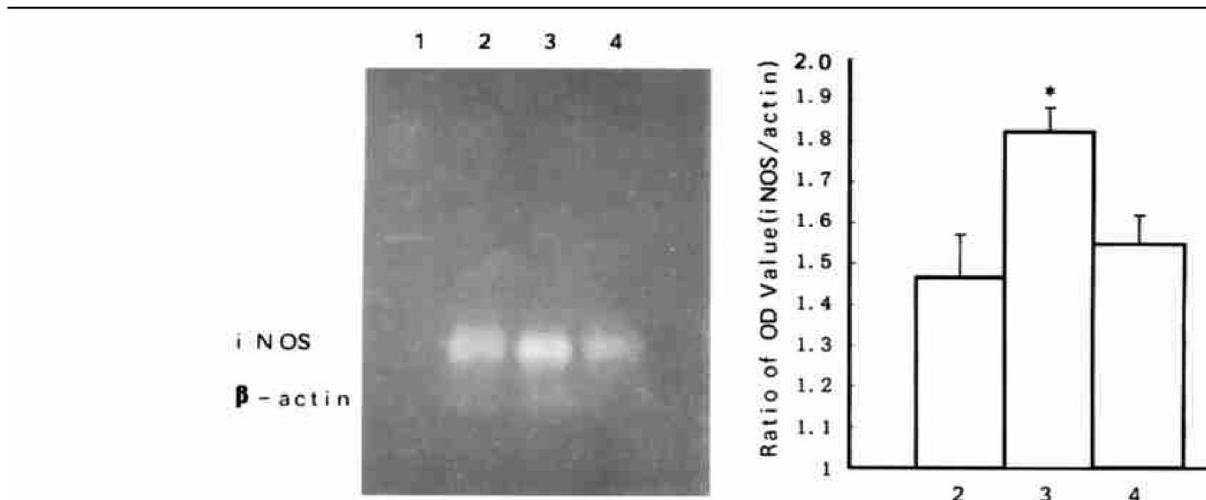


图 2. 核因子- κB 抑制剂 PDTC 对 tBOOH 诱导 RAW264.7 细胞诱导型一氧化氮合酶表达的影响

Figure 2. RT-PCR analysis: effect of PDTC on tBOOH induced inductive nitric oxide synthase mRNA expression in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$). 1: 100 bp DNA marker; 2: Control; 3: 1.5×10^{-4} mol/L tBOOH treated; 4: 1.5×10^{-4} mol/L tBOOH + 100 $\mu\text{g/L}$ PDTC. * : $P < 0.05$, compared with the optical density of other lanes.

3 讨论

一氧化氮是近年来广为关注的分子,其在多种器官及系统中的病理生理作用均受到重视。巨噬细胞的某些生物学功能与一氧化氮的释放有关,例如激活的巨噬细胞通过合成一氧化氮可发挥非特异性杀菌和杀伤肿瘤的作用,并通过多种途径引起免疫连锁反应。近年来的研究还发现,单核巨噬细胞来源的一氧化氮在动脉粥样硬化性疾病的病理发生发展过程中扮演重要角色^[3,4]。氧化型低密度脂蛋白是动脉粥样硬化的重要致病因子,而一氧化氮对低密度脂蛋白的氧化修饰具有抑制作用^[5,6],从这点意义上看,氧化应激对巨噬细胞 iNOS 的诱导作用,可以看作是动脉粥样硬化病理过程中的保护性反应之一。也就是说,在氧化型低密度脂蛋白等氧化剂造成氧化应激的条件下,单核巨噬细胞一氧化氮的合成被诱导增加,反过来抑制正常低密度脂蛋白被继续氧化为氧化型低密度脂蛋白,切断了恶性循环,有利于减轻病变^[7]。已知包括感染在内的多种其它病理情况均有活性氧的参与,通过类似的机制 iNOS 被诱导表达,也可在其它疾病的病理生理过程中起到保护机体的作用。

在我们的实验中采用了几种阻断剂,其中放线菌素 D 常被用来抑制 mRNA 的合成,环己酰亚胺则是蛋白质合成的抑制剂。应用这二种抑制剂的研究显示,两者均可以减少 tBOOH 诱导的 RAW264.7 细胞 iNOS mRNA 合成,说明 tBOOH 在转录水平对巨噬细

胞 iNOS 的表达产生影响,且新蛋白质的合成参与了这一诱导过程。活性氧近年来被认为可以作为介导某些基因表达诱导的细胞内信使,因此我们进一步研究了超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)在 tBOOH 诱导 RAW264.7 细胞 iNOS 表达过程中的作用。acetovanilone 可以特异性地抑制细胞内源性 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的产生^[8],在本研究中其能减弱 tBOOH 对 iNOS 表达的诱导,说明诱导细胞内源性 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生可能是 tBOOH 影响巨噬细胞 iNOS 表达的途径之一。在 iNOS 基因的调节序列中存在核因子- κB 同源序列,而氧化应激对基因表达的诱导往往是通过激活转录因子核因子- κB 实现的。PDTC (pyrrolidinedithiocarbamate) 是公认的核因子- κB 特异性抑制剂^[9],我们的实验发现 100 $\mu\text{g/L}$ 的 PDTC 可以阻断氧化剂对 RAW264.7 细胞 iNOS 表达的诱导,说明氧化剂的这一诱导作用是通过激活核因子- κB 而完成的。

参考文献

- [1] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156-159
- [2] Kalaria RN, Premkumar DRD, Lin CW, et al. Identification and expression of the Na^+/H^+ exchanger in mammalian cerebrovascular and choroidal tissues: characterization by amiloride-sensitive [^3H] MIA binding and RT-PCR analysis [J]. *Mol Brain Res*, 1998, **58**: 178-187
- [3] Kauser K, da Cunha V, Fitch R, et al. Role of endogenous nitric

- oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, **278**(5): H1 679– 685
- [4] Carr AC, Mc Call MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**(7): 1 716– 723
- [5] Jessup W, Dean RT. Autoinhibition of murine macrophage-mediated oxidation of low density lipoprotein by nitric oxide synthesis [J]. *Atherosclerosis*. 1993. **101**: 145– 155
- [6] Hogg N, Struck A, Goss SP, et al. Inhibition of macrophage-dependent low density lipoprotein oxidation by nitric oxide donors [J]. *J Lipid Res*, 1995, **36**: 1 756– 762
- [7] Bloodsworth A, O'Donnell VB, Freeman BA. Nitric oxide regulation of free radical and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**(7): 1 707 – 715
- [8] Kimpe SD, Muijsers R, van Heuvel-Nolsen D, et al. Nitric oxide rather than peroxynitrite contributes to the loss of viability in macrophages after gram positive cell wall components [J]. *Japn J Pharmacol*, 1997, **75**(suppl I): P– 319
- [9] Baumann B, Kistler B, Kirillov A, et al. The mutant plasmacytoma cell line S107 allows the identification of distinct pathways leading to NF- κ B activation [J]. *J Biol Chem*. 1998. **273**(19): 11 448– 455
- (此文 2000– 10– 20 收到, 2001– 04– 10 修回)
(此文编辑 朱雯霞)