

细菌脂多糖诱导人外周血单核细胞肿瘤坏死因子 α 的合成及核因子- κ B的活化

李凝旭, 李建军, 李庚山, 王 晶, 徐红新, 李 夏, 彭 俊

(武汉大学人民医院心内科, 湖北省武汉市 430060)

[主题词] 炎症; 肿瘤坏死因子; 单核细胞; 核因子- κ B; 免疫细胞化学

[摘 要] 为研究细菌脂多糖对人外周血单核细胞肿瘤坏死因子 α 合成和核因子- κ B活化的影响, 采用密度梯度离心法分离人外周血单核细胞, 经细菌脂多糖刺激后, 应用酶联免疫吸附法检测肿瘤坏死因子 α 水平随刺激剂量和时间的变化, 应用免疫细胞化学方法观察核因子- κ B在单核细胞的激活随刺激时间的变化。发现核因子- κ B在接受刺激15 min~1 h之间, 随刺激时间的延长逐渐从胞质向胞核转移, 1 h达高峰。细菌脂多糖呈浓度依赖性(1~1 000 μ g/L)诱导肿瘤坏死因子 α 合成, 肿瘤坏死因子 α 在刺激后1 h出现, 6 h达到高峰, 其合成出现在核因子- κ B的活化后。以上提示细菌脂多糖通过激活单核细胞内核因子- κ B来诱导炎症细胞因子肿瘤坏死因子 α 的合成。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Lipopolysaccharide Induced Tumor Necrosis Factor- α Synthesis and Nuclear Factor Kappa B Activation in Human Monocytes

LI Ning-Xu, LI Jiann-Jun, LI Yur-Shan, WANG Jing, XU Hong-Xin, LI Xia, and PENG Jun

(Department of Cardiology, People Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

[MeSH] Inflammation; Tumor Necrosis Factor; Monocytes; Nuclear Factor kappa B; Immunohistochemistry

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the effect of lipopolysaccharide on human monocytes tumor necrosis factor α production and nuclear factor kappa B activation. **Methods** Monocytes were isolated by Ficoll density gradient from blood of healthy volunteers. The amount of tumor necrosis factor α protein in culture medium was quantified by using tumor necrosis factor α ELISA systems. Nuclear factor kappa B translocation in monocytes was observed by immunohistochemistry assay. **Results** We find that nuclear factor kappa B was activated after being stimulated for 15 minutes and reached peak at 1 hour. Lipopolysaccharide (1 μ g/L~1 mg/L) induced monocytes tumor necrosis factor α production in a dose-dependent manner. Tumor necrosis factor α protein in medium could be detected at 1 hours, and achieve peak at 6 hour. Nuclear factor kappa B activation before tumor necrosis factor α production in monocytes. **Conclusions** Lipopolysaccharide induced proinflammation cytokine production at least in part through nuclear factor kappa B activation in monocytes.

单核/巨噬细胞是人体最主要的免疫/炎症细胞, 同时也是动脉粥样硬化斑块的重要组成成分。核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)是一种重要的炎症转录因子, 许多炎症基因的表达是通过NF- κ B的活化来实现的。本文以细菌脂多糖诱导人外周血单核细胞的炎症反应, 并观察NF- κ B在单核细胞炎症反应中的作用, 以确立NF- κ B的活化与单核细胞炎症反应的关系。

1 试剂与方法

1.1 试剂

[收稿日期] 2001-11-29 [修回日期] 2002-06-16

[作者简介] 李凝旭, 女, 1977年出生, 心血管内科硕士研究生, 主要研究方向为冠心病。李建军, 男, 1957年出生, 博士后, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为冠心病。李庚山, 男, 1932年出生, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为冠心病。

细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) 011B4(Sigma), 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α), ELISA试剂盒(Genzyne), p65鼠抗人单克隆抗体(Santa Cruz), RPMI1640(GIBCO), 淋巴细胞分离液(上海化学试剂二厂)。

1.2 外周血单核细胞的分离培养与鉴定

采健康志愿者外周血, 生理盐水1:1稀释, 用吸管轻铺于比重1.077淋巴细胞分离液表面, 稀释血与淋巴细胞分离液体积约2:1, 形成清晰界面。用水平或台式离心机1 500 r/min离心25 min, 离心后单个核细胞悬于分层液面, 呈白膜状。用吸管轻轻将单个核细胞吸入另一管内。用生理盐水清洗2次(1 500 r/min, 7 min)。使用台式离心机, 常带有少量红细胞, 可用红细胞裂解液(150 mmol/L NH_4Cl , 10 mmol/L NaHCO_3 , 1 mmol/L Na_4EDTA)^[1]去除。将清洗后的细胞重悬于RPMI1640(含25 mmol/L HEPES,

1 nmol/L 谷氨酰胺, 1.0×10^5 u/L 青霉素和链霉素), 台盼蓝拒染实验示活细胞 > 95%。将细胞接种于 24 孔培养板, 每孔 1 mL, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 1 h 后吸出培养基, 用新鲜培养基用力清洗 3 次, 将未贴附细胞洗脱, 贴附细胞为单核细胞^[2,3]。用细胞刮片将细胞刮下, 重悬于上述 RPMI1640 并调整细胞密度为 1×10^6 /L。将粘附于盖玻片上的单核细胞用瑞氏染色鉴定, 80% 细胞为单核细胞, 细胞核呈肾形及马蹄形, 紫蓝色。

1.3 试验分组

不同浓度脂多糖(1、10、100 和 1 000 μg/L) 作用于人单核细胞 6 h 对 TNF-α 浓度影响; ④脂多糖(1 mg/L) 作用于人单核细胞不同时间(0、0.5、1、2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 h) 对 TNF-α 浓度影响; ④选取最佳浓度脂多糖(1 mg/L) 作用于人单核细胞不同时间(5、15、30、60 和 120 min) 对单核细胞中 NF-κB 激活的影响。

1.4 酶联免疫吸附测定

培育后收集上清, 按照试剂盒操作说明进行, 主要步骤如下: 将不同浓度的 TNF-α 标准品(2 000、1 000、500、250、125、62.5 和 31.25 ng/L) 及待测样品以每孔 100 μL 加入酶标孔, 室温下孵育 120 min, 洗板 4 次。加检测剂工作液, 室温 60 min, 洗板 4 次。加底物显色剂避光室温 30 min, 加终止液。在 450 nm 波长下读取各孔吸光度值(OD 值)。以浓度值为横坐标, 所测各标准 OD 值为纵坐标, 绘制标准曲线。利用各样本孔测得的 OD 均值, 从标准曲线上查得相应的浓度值, 以 ng/L 表示。每个待测值均作 4 个样本, 每个样品及标准品各浓度均作复孔。

1.5 免疫细胞化学

采用 SP 法, 终止培养后, 用生理盐水清洗 2 次, 置于 -20℃ 甲醇中固定 10 min, 生理盐水洗一次。用 3% PBS 稀释的 H₂O₂ 室温 30 min, 去除内源性过氧化物酶, PBS 洗 3 次, 羊血清 37℃ 封闭 30 min, 加一抗(1:50) 4℃ 过夜, PBS 洗 3 次, 加二抗 37℃ 30 min, PBS 洗 3 次, 链酶卵白素辣根过氧化物酶 37℃ 30 min, PBS 洗 3 次, DAB 镜下显色。每个测定值制 4 张片, 每张片取 200 个细胞。用全自动图像分析仪(Olympas BX50 显微摄影系统, Polaroid DMC1 数码相机, 联想奔月 2000 型计算机), 采用 HPIAS2000 型图像分析软件测定平均光密度值(OD)、阳性反应面积(Ar)和阳性细胞率(Pr)。

1.6 统计处理

数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 *t* 检验判断均数差异显著性。

2 结果

2.1 不同浓度的脂多糖对单核细胞合成肿瘤坏死因子 α 的影响

如图 1(Figure 1) 所示, 在不同浓度脂多糖刺激下, 单核细胞合成 TNF-α 随脂多糖浓度的增加而增加, 其中以 1 mg/L 脂多糖刺激作用最强。单核细胞 TNF-α 的合成对脂多糖的刺激呈剂量依赖性。

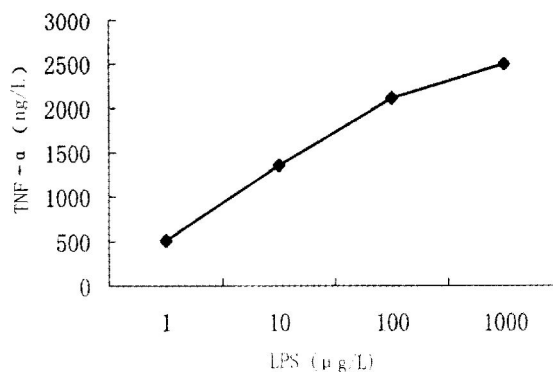


图 1. 不同浓度细菌脂多糖作用于人单核细胞 6 h 对肿瘤坏死因子 α 合成的影响(*n* = 4)。

Figure 1. Effects of different concentration of lipopolysaccharide on tumor necrosis factor-α production in human monocytes.

2.2 脂多糖作用不同时间对肿瘤坏死因子 α 合成的影响

如图 2(Figure 2) 所示, 单核细胞在脂多糖(1 mg/L) 刺激后 1 h 开始合成 TNF-α, 在 6 h 内随刺激时间延长 TNF-α 合成增加, 刺激 6 h 时达到高峰, 达峰值后, TNF-α 合成呈缓慢下降趋势, 但持续到 18 h 仍保持较高浓度。

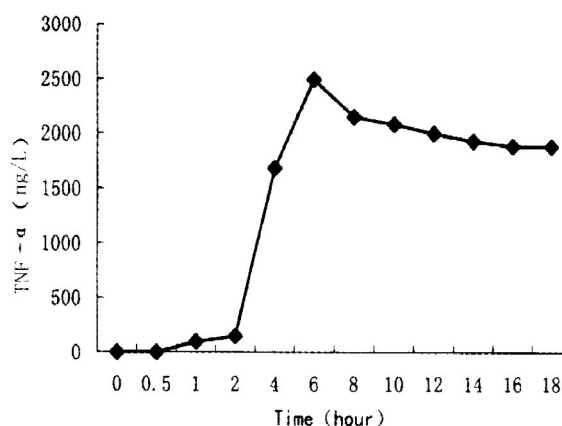


图 2. 细菌脂多糖(1 mg/L) 作用于人单核细胞不同时间对肿瘤坏死因子 α 合成的影响(*n* = 4)。

Figure 2. The time curve of human monocytes Tumor necrosis factor-α production induced by lipopolysaccharide (*n* = 4).

2.3 免疫细胞化学检测

如图 3(Figure 3) 所示未受刺激的细胞核染色较蓝,核中无阳性染色;刺激 5 min 细胞染色情况与未受刺激的细胞无明显区别;刺激 15 min 细胞核周开始出现新月状阳性染色区域;刺激 0.5 h 胞核中阳性染色区域逐渐扩大;到 1 h 胞核中阳性染色达到高峰,可见整个胞核被阳性染色区覆盖,核蓝染受抑制,这种情况持续到 2 h。图像分析结果表明,刺激 15 min 以后各组核中阳性染色平均光密度值、阳性反应面积和阳性细胞率与对照组及刺激 5 min 组比较有明显差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。刺激 5 min 组与对照组比较无明显差异(表 1, Table 1)。

表 1. 细菌脂多糖(1 mg/L) 诱导人单核细胞核因子-κB 活化不同时间变化结果.

Table 1. The time curve of nuclear factor kappa B activation induced by lipopolysaccharide($\bar{x} \pm s$).

Groups	OD	Ar(μm^2)	Pr(%)
Control	0.167±0.015	0.376±0.130	3.4±1.2
LPS 5 min	0.134±0.016	0.386±0.160	7.5±3.7
LPS 15 min	0.182±0.028 ^a	2.038±1.298 ^a	57.2±1.9 ^a
LPS 30 min	0.217±0.035 ^b	5.722±4.055 ^b	75.9±5.9 ^b
LPS 60 min	0.254±0.054 ^b	7.219±3.767 ^b	96.3±1.3 ^b
LPS 120 min	0.220±0.028 ^b	5.383±4.710 ^b	82.0±2.7 ^b

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

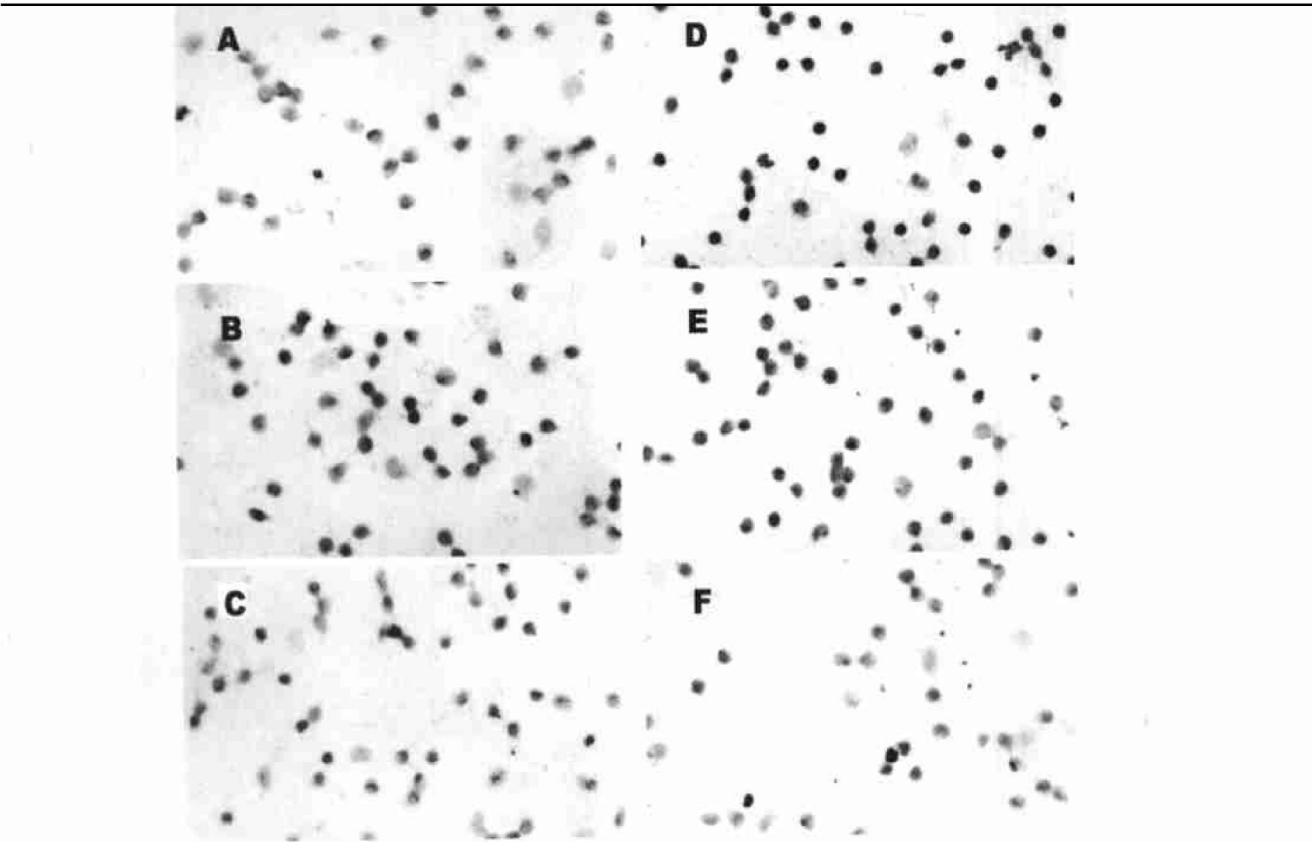


图 3. 细菌脂多糖(1 mg/L) 作用人单核细胞核因子 κB 活化不同时间的免疫细胞化学检测结果(×100). A: 对照组; B: 脂多糖 5 min; C: 脂多糖 15 min; D: 脂多糖 30 min; E: 脂多糖 1 h; F: 脂多糖 2 h.

Figure 3. Immunocytochemistry assay of NF-κB activation in human monocytes induced by LPS (1 mg/L) (×100). A: Control; B: LPS 5 min; C: LPS 15 min; D: LPS 30 min; E: LPS 1 h; F: LPS 2 h.

3 讨论

单核-巨噬细胞是人体最主要的免疫-炎性细胞,同时它也是粥样硬化斑块的重要组成部分,它从多个不同途径促进粥样硬化损伤进展,刺激纤维-肌反应;④损伤内皮;⑤促进脂质向内膜聚集^[1]。粥样硬化损伤是否会引发临床心血管事件并不一定取决于斑块的大小,更重要的是由斑块的内在生物学特性决定的。斑块破裂和血栓形成可导致急性冠状

动脉综合征,斑块是否破裂取决于斑块的组成和强度。慢性炎症改变特别是巨噬细胞的激活,会促使粥样斑块不稳定并最终破裂^[2]。

冠心病人体内不仅存在粥样硬化斑块局部的细胞炎症反应,在急性冠状动脉综合征患者体内还存在循环炎症反应。Mazzon 等^[3]报道在心脏受损后,冠状窦部的单核细胞表面 CD11b/CD18 受体较主动脉窦部的表达增加,而这些受体使单核细胞易于与

血小板及内皮细胞发生交互作用而使内皮受损及血栓形成。在缺血性心脏病模型中单核细胞与冠状动脉主支的内皮细胞发生交互作用后导致内皮功能紊乱^[4]。

脂多糖是革兰氏阴性杆菌外膜的主要组成成分,它能引发各种炎症过程如发热、感染性休克、内皮功能紊乱和血栓的形成等。以往的研究发现脂多糖与宿主细胞主要依靠脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)相联系。脂多糖与单核细胞 LBP 结合后,可与单核细胞分化抗原 CD14 结合,诱导单核细胞合成炎症细胞因子、粘附分子和组织因子等^[5]。

许多炎症基因的表达是通过 NF- κ B 的活化来实现并参与粥样硬化的形成。NF- κ B 是一种重要的核转录因子,活化后可在转录水平上调节大多数炎症介质的表达。1986 年 San 和 Baltimore 首次发现在成熟 B 细胞和浆细胞中存在与免疫球蛋白 K 轻链增强子 10 bp DNA 序列(5'-GGGACITTC-3')特异结合的蛋白——真核转录因子 NF- κ B。哺乳动物的 Rel/NF- κ B 家族由 5 个成员组成, NF- κ B1/p50、NF- κ B2/p52、C-Rel、RelA/p65 和 RelB,通常所指的 NF- κ B 是 NF- κ B1/p50 与 RelA/p65 组成的杂二聚体,在静息状态下与其抑制成分 I κ B 结合存在于胞质中。在受到外界刺激如 TNF- α 和脂多糖会导致 I κ B 磷酸化及降解,从而使得 NF- κ B 能进入胞核调节特异基因表达^[6-8]。有研究发现在粥样硬化损伤处平滑肌细胞、内皮细胞及单核细胞中均可见 NF- κ B 亚群 p65 阳性染色^[9]。这些研究说明 NF- κ B 的活化与粥样硬化损伤的形成有密切的关系。在不稳定型心绞痛患者体内有选择性高度激活的 NF- κ B, 17/19 例不稳定型心绞痛患者体内有 NF- κ B 活化,而在 83 例稳定型心绞痛患者体内只有 2 例激活,并且这 2 例患者在 24 h 内发展成为不稳定型心绞痛^[10]。NF- κ B 的活化可能是促使粥样硬化损伤发展的重要因素。将缺血性心脏病(包括稳定及不稳定型心绞痛)患者外周血单核细胞分离培养,检测培养基中 TNF- α 水平明显高于健康对照组($P < 0.02$)^[11],说明 TNF- α 增高与粥样硬化损伤形成有关。TNF- α 是一种促炎因子,在本实验中 TNF- α 作为一种炎性标志物被用于判断单核细胞的炎症反应。

我们的研究发现在 1 μ g/L~1 mg/L 脂多糖作用下, TNF- α 的合成随刺激剂量的增加而增加, 1 mg/L 脂多糖对单核细胞 TNF- α 合成的诱导作用最强。说

明在这个剂量范围内脂多糖不会对单核细胞产生细胞毒性作用。但根据其它的研究结果表明若脂多糖刺激剂量继续增加达到 10 mg/L 则 TNF- α 的合成反而会减少,这可能与脂多糖的细胞毒性作用有关。

本实验应用免疫细胞化学方法研究在脂多糖刺激下 NF- κ B 随时间从胞浆到胞核的转移过程,并研究 NF- κ B 的活化与炎症细胞因子 TNF- α 合成的关系。在试验中我们发现在脂多糖刺激后 15 min, NF- κ B 即可活化从胞浆中转移入胞核。NF- κ B 对外界刺激迅速的反应可能使 NF- κ B 很快地与所有细胞核中特异片段结合而发挥生理作用。NF- κ B 在脂多糖刺激后 15 min 到 1 h 之间,逐渐从胞质转移到胞核,在 1 h 达高峰。而 TNF- α 在刺激后 0.5 h 还未开始合成, TNF- α 出现晚于 NF- κ B 的活化。说明脂多糖刺激单核细胞后,通过激活 NF- κ B 而影响细胞合成炎症细胞因子,从而引起一系列的炎症反应,包括粥样硬化斑块的形成与发展。

在本研究中我们证实: 脂多糖是单核细胞 NF- κ B 激活的刺激因子; ④脂多糖对单核细胞炎症细胞因子合成的诱导作用至少部分是通过 NF- κ B 激活通路发挥作用的; ④作出脂多糖诱导单核细胞合成 TNF- α 的时间和剂量曲线及 NF- κ B 活化的时间曲线,为今后的研究提供依据。

[参考文献]

- [1] Capron L. Leukocyte and atherosclerosis. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1991, **84**: 1 845-850
- [2] Kloner RA, Giacomelli F, Alker KJ, et al. Influx of neutrophil into the walls of large epicardial coronary arteries in response to ischaemia/reperfusion. *Circulation*, 1991, **84**: 1 758-772
- [3] Mazzone A, De Servi S, Ricevuti G. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation*, 1993, **88**: 358-363
- [4] Schroeder AP, Falk E. Pathophysiology and inflammatory aspects of plaque rupture. *Cardiol Clin*, 1996, **14**: 211-220
- [5] Banks J, Polle S, Nair SP, et al. Streptococcus sanguis secretes CD14-binding proteins that stimulate cytokine synthesis: a clue to the pathogenesis of infective (bacterial) endocarditis? *Microb Pathog*, 2002, **32**: 105-116
- [6] Abraham E. NF- κ B activation. *Crit Care Med*, 2000, **28**: 100-104
- [7] Jane DA, Hubner S. Regulation of protein transport to the nucleus: Central role of phosphorylation. *Physio Rev*, 1996, **76**: 651-658
- [8] Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: 10 year after. *Cell*, 1996, **88**: 13-20
- [9] Brand K, Page S, Rogler G, et al. Activated transcription factor nuclear factor kappa B is present in the atherosclerosis lesion. *J Clin Invest*, 1996, **97**: 1 715-722
- [10] Ritchie ME. Nuclear factor- κ B is selectively and markedly activated in human with unstable angina pectoris. *Circulation*, 1998, **98**: 1 707-713
- [11] Vaddi K, Nicolini FA, Mehta P, et al. Increased secretion tumor necrosis factor- α and interferon- γ by mononuclear leukocytes in patients with ischemic heart disease. Relevance in superoxide anion generation. *Circulation*, 1995, **92**: 3 362-363

(此文编辑 朱雯霞)