

# 佛波酯对 LPS/IFN- $\gamma$ 诱导的巨噬细胞活性氧产生的影响

陆红玲<sup>1</sup>, 黄 跃<sup>2</sup>, 冯赞杰<sup>1</sup>, 涂应琴<sup>1</sup> (遵义医学院: 1. 生物化学教研室; 2. 电镜室, 贵州 563003)

**【摘要】 目的** 研究佛波酯(PMA)对脂多糖/ $\gamma$ -干扰素(LPS/IFN- $\gamma$ )诱导的巨噬细胞 RAW264.7 活性氧产生的影响。**方法** 于实验前 0、3、6、9、12、18 h, 用 1  $\mu$ g/mL 的 LPS 和 100 U/mL IFN- $\gamma$  诱导处于对数生长期的 RAW264.7 细胞, 采用蛋白质印迹技术检测细胞中一氧化氮合酶(iNOS)的表达; 对经 LPS/IFN- $\gamma$  诱导 12 h 的 RAW264.7 细胞加入终浓度为 200 ng/mL 的 PMA, 应用激光共聚焦显微技术观察 RAW264.7 细胞中活性氧的产生。**结果** LPS/IFN- $\gamma$  可使 RAW264.7 细胞的诱导型 iNOS 表达增加, 同时 PMA 可刺激经 LPS/IFN- $\gamma$  诱导后的 RAW264.7 细胞产生呼吸爆发, 细胞的荧光强度较未刺激组增强 ( $P < 0.01$ )。**结论** PMA 可促使经 LPS/IFN- $\gamma$  诱导的 RAW264.7 细胞产生大量活性氧。

**【关键词】** 佛波酯; 可诱导型一氧化氮合酶; 巨噬细胞 RAW264.7; 活性氧

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.16.011 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)16-1993-02

**The influence of phorbol-1,2-myristate-1,3-acetate on the production of reactive oxygen species by LPS/IFN- $\gamma$  induced in RAW264.7 macrophages** LU Hong-Ling<sup>1</sup>, HUANG Yue<sup>2</sup>, FENG Zan-Jie<sup>1</sup>, TU Ying-Qin<sup>1</sup> (1, Department of Biochemistry; 2, Department of Electron Microscopy Room, Zunyi Medical College, Guizhou 563003, China)

**【Abstract】 Objective** To study the influence of phorbol-1,2-myristate-1,3-acetate (PMA) on the production of reactive oxygen species(ROS) by LPS/IFN- $\gamma$  induced in RAW264.7 macrophages. **Methods** RAW264.7 macrophages were stimulated with 1  $\mu$ g/mL LPS and 100 U/mL IFN- $\gamma$  at 0,3,6,9,12,18 h, respectively. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) were assayed by western blotting. The 200 ng/mL PMA was added at last concentration to detected the production of ROS by laser scanning confocal microscope. **Results** The expression of iNOS increased significantly after treatment by LPS/IFN- $\gamma$ . The inducible RAW264.7 macrophages produced respiratory burst by stimulated with PMA. **Conclusion** PMA promote a great amount of reactive oxygen species(ROS) produced in the inducible RAW264.7 macrophages with LPS/IFN- $\gamma$ .

**【Key words】** phorbol-1,2-myristate-1,3-acetate; inducible nitric oxide synthase; RAW264.7 macrophage; reactive oxygen species

巨噬细胞是一种参与机体非特异性免疫防御的重要免疫细胞<sup>[1-2]</sup>。在受到外界刺激处于应激状态时,巨噬细胞会产生呼吸爆发,通过还原型辅助酶 II (NADPH)氧化酶产生大量的超氧阴离子;与此同时细胞内的可诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)基因被诱导表达,产生大量的一氧化氮<sup>[3-4]</sup>。同时,产生的一氧化氮与超氧阴离子迅速反应,生成具有强氧化性的过氧化亚硝基,对细胞产生毒性和不良反应<sup>[5]</sup>。目前,虽然有报道显示在免疫防御过程中,超氧阴离子和一氧化氮存在相互协同<sup>[5]</sup>,但这一推论还缺乏直接的实验证据。本实验通过观察脂多糖/ $\gamma$ -干扰素(LPS/IFN- $\gamma$ )诱导巨噬细胞一氧化氮合酶(iNOS)表达及佛波酯(phorbol-1,2-myristate-1,3-acetate, PMA)诱导巨噬细胞中活性氧产生情况,以探讨超氧阴离子和一氧化氮的协同作用。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** RAW264.7 细胞株来源于中国科学院细胞库,细胞培养瓶(Costar 公司),DMEM 培养基(Gibco BRL 公司),新生牛血清(Hyclone 公司), $\gamma$ -干扰素、脂多糖、PVDF 膜、RNase A、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、佛波酯(phorbol-1,2-myristate-1,3-acetate, PMA)、HEPES、胰蛋白酶(Amresco 公司),蛋白酶 K(Merck 公司)、iNOS 一抗及二抗、增强化学发光检测试剂盒(Pierce 公司),2',7'-二氯双氢荧光素,其余为国产试剂。

## 1.2 方 法

**1.2.1 LPS/IFN- $\gamma$  诱导 RAW264.7 细胞中 iNOS 基因的表达**

**1.2.1.1 RAW264.7 细胞的培养及处理** RAW264.7 细胞

的培养条件为:含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基,5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 培养箱,常规换液以维持细胞处于对数生长期。实验前 27 h,将培养基换为不含血清的 DMEM 培养基。分别于实验前 0、3、6、9、12、18 h,用 1  $\mu$ g/mL 的 LPS 和 100 U/mL 的 IFN- $\gamma$  诱导处于对数生长期的 RAW264.7 细胞。收集细胞沉淀,加入细胞裂解液,在 4  $^{\circ}$ C 裂解 30 min。于 11 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,以牛血清清蛋白为标准,用 Bradford 方法测定蛋白浓度。

**1.2.1.2 Western Blot 分析** 以 40  $\mu$ g 的胞浆蛋白提取物,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。用半干转移系统进行免疫印迹,转印后的膜用 TBST 溶液(含 0.1% 吐温 20 的 TBS)封闭 3 h,与 iNOS 一抗 4  $^{\circ}$ C 反应过夜,洗膜后再与 iNOS 二抗作用 1 h,最后用增强化学发光检测试剂盒显色,用 X 光胶片曝光检测。

**1.2.2 激光共聚焦显微镜观察 RAW264.7 细胞中活性氧的变化**

**1.2.2.1 RAW264.7 细胞的培养及处理** 将 RAW264.7 细胞( $2 \sim 3 \times 10^4$  个细胞)接种于 35 mm 细胞培养皿中并分组。A 组(对照组):未经过任何处理的细胞;B 组(未诱导组):未诱导细胞和 PMA;C 组(诱导组):经 LPS/IFN- $\gamma$  诱导 12 h 后的细胞和 PMA。

**1.2.2.2 激光共聚焦显微镜观察** 各组于测定前加入终浓度为 10  $\mu$ mol 的 DCFH-DA 于 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min,除对照组外,其余两组于测定时再加入终浓度为 200 ng/mL 的 PMA,各组在 FV500 型激光共聚焦显微镜下观察细胞荧光变化并拍照。

**1.3 统计学处理** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS11.5 统计软件处理,组间比较采用双因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 LPS/IFN- $\gamma$  诱导 RAW264.7 细胞中 iNOS 基因的表达**  
 未经过诱导的 RAW264.7 细胞中无 iNOS 蛋白的表达(0 h);诱导 3 h 后即有 iNOS 的表达,9 h 后 iNOS 的表达量随诱导时间的增加而趋于稳定,反映在 Western Blotting 的印记基

本保持不变。见图 1。

**2.2 激光共聚焦显微镜观察 RAW264.7 细胞荧光变化** 经 LPS/IFN- $\gamma$  诱导 12 h 后的 RAW264.7 细胞,加入 PMA 作用后,其细胞内的荧光强度较 A 组(对照组)和 B 组(未诱导组)均明显增强( $P < 0.01$ ),见表 1 和图 2,在 900 秒时达高峰,随着时间的延长荧光强度逐渐减弱(图 3)。未诱导的 RAW 264.7 细胞加入 PMA 作用后,荧光强度较对照组明显增加( $P < 0.01$ ),但稍弱于 C 组(诱导组),且持续时间较短。

表 1 RAW264.7 细胞荧光强度变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	0(s)	180(s)	360(s)	540(s)	720(s)	900(s)	1 080(s)	1 200(s)
A 组	762.21±41.35	723.57±56.42	682.03±46.23	612.13±51.75	576.46±38.56	504.74±44.02	461.73±65.34	410.93±52.43
B 组	616.36±55.95 <sup>a</sup>	889.91±74.27 <sup>a</sup>	987.51±61.55 <sup>b</sup>	1047.70±79.47 <sup>b</sup>	1016.55±124.36 <sup>b</sup>	970.64±85.80 <sup>b</sup>	938.00±91.66 <sup>b</sup>	862.73±101.77 <sup>b</sup>
C 组	1 090.73±116.99 <sup>bc</sup>	1 086.94±104.39 <sup>bc</sup>	1 069.15±88.50 <sup>b</sup>	1 042.73±113.03 <sup>b</sup>	1 095.09±86.36 <sup>b</sup>	1 159.00±108.44 <sup>bc</sup>	1 012.58±126.37 <sup>b</sup>	940.71±117.31 <sup>b</sup>

注:与 A 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与 B 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.01$ 。

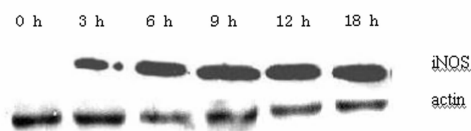
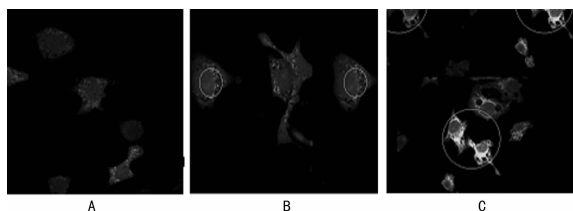


图 1 Western Blotting 检测 RAW264.7 细胞中 iNOS 基因表达水平



注:A 为对照组;B 为未诱导组;C 为 LPS/IFN- $\gamma$  诱导组。

图 2 激光共聚焦显微镜观察不同组 RAW264.7 细胞的呼吸爆发( $\times 100$ )

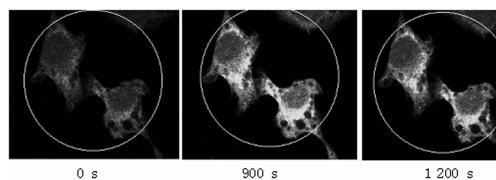


图 3 激光共聚焦显微镜观察 PMA 诱导的 RAW264.7 细胞的呼吸爆发( $\times 400$ )

**3 讨 论**

本研究以巨噬细胞株 RAW264.7 为研究对象,研究了 LPS/IFN- $\gamma$  对 RAW264.7 细胞 iNOS 基因表达的诱导作用及 PMA 对其刺激引起的呼吸爆发作用。PMA 是 PKC 的激活剂,它可以刺激巨噬细胞产生呼吸爆发,生成大量超氧阴离子和其他活性氧<sup>[3]</sup>。在静息态的巨噬细胞中,由 PMA 刺激而产生的化学发光主要来源于氧自由基;而在已经表达了 iNOS 的巨噬细胞中(经过 LPS/IFN- $\gamma$  处理的 RAW264.7 巨噬细胞),化学发光来源于氧自由基和一氧化氮的共同作用<sup>[5-6]</sup>。

本研究曾通过化学发光法测定巨噬细胞呼吸爆发动力学,观察到高表达可诱导型 iNOS 的巨噬细胞经 PMA 刺激后可产生呼吸爆发<sup>[7]</sup>,而在本研究中通过 Western Blotting 和激光共聚焦显微技术,进一步证实了由 LPS/IFN- $\gamma$  诱导 RAW264.7

细胞表达 iNOS,后者促进一氧化氮的合成,NO 再与超氧阴离子反应形成氧化性极强的过氧化亚硝基而产生强烈的化学发光,与未表达 iNOS 基因的巨噬细胞相比,依赖于氧化氮的化学发光及激光共聚焦的荧光强度,均远远强于仅由超氧阴离子等活性氧而引起的变化。活性氧和一氧化氮的协同产生可能在巨噬细胞杀死微生物和异常细胞中发挥重要作用,因此对两者协同作用的机制尚需进一步探讨。

**参考文献**

- [1] Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals[J]. J Pathol, 2008, 214(2): 161-178.
- [2] Ewelina S, Dariusz S, Zenon P, et al. Inhibition of inflammatory mediators by neobavaisoflavone in activated RAW264.7 macrophages[J]. Molecules, 2011, 16(5): 3701-3712.
- [3] Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 166(12 Pt 2): S4-8.
- [4] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidase: physiology and pathophysiology[J]. Physiol Rev, 2007, 87(1): 245-313.
- [5] Deschacht M, Horemans T, Martinet W, et al. Comparative EPR study of different macrophage types stimulated for superoxide and nitric oxide production[J]. Free Radical Research, 2010, 44(7): 763-772.
- [6] Christian A, St phane A, Alaric CWK. Simultaneous detection of reactive oxygen and nitrogen species released by a single macrophage by triple potential-step chronoamperometry[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(4): 1411-1419.
- [7] Zhao K, Huang Z, Lu HL, et al. Induction of inducible nitric oxide synthase increases the production of reactive oxygen species in RAW264.7 macrophages[J]. Bioscience Reports, 2010, 30(4): 233-241.

(收稿日期:2012-02-17)