

褪黑素对 ox-LDL 所致巨噬细胞 TNF- α 释放及核因子 κ B 活性的影响

张 弛¹, 黄 靓^{1,2}, 余美华¹, 尹卫东¹

(1. 南华大学 心血管病研究所 动脉硬化湖南省重点实验室, 湖南 衡阳 421001;

2. 南华大学 外科学总论教研室)

摘要: **目的** 探讨褪黑素对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)所致的巨噬细胞肿瘤坏死因子 α (TNF- α)释放及核因子 κ B 活性的影响。 **方法** 以 ox-LDL、ox-LDL 加不同浓度的褪黑素处理 RAW264.7 小鼠巨噬细胞,采用酶联免疫吸附测定细胞上清液中 TNF- α 的浓度,免疫印迹法检测 p65/核因子 κ B 的核移位,凝胶电泳迁移率分析核因子 κ B 与 DNA 的结合活性。 **结果** 褪黑素能够显著减少 ox-LDL 所致的巨噬细胞 TNF- α 的释放,且 p65/核因子 κ B 的核移位减少,核因子 κ B 与 DNA 的结合活性降低。 **结论** 褪黑素减少 ox-LDL 所致的巨噬细胞 TNF- α 的释放与其调节核因子 κ B 的活性有关。

关键词: 褪黑素; 氧化型低密度脂蛋白; 巨噬细胞; 肿瘤坏死因子 α ; 核因子 κ B

中图分类号:R541.4 文献标识码:A 文章编号:2095-1116(2011)01-0014-04

The Effect of Melatonin on the Release of TNF- α and the Activity of NF- κ B Elicited by ox-LDL

ZHANG Chi, HUANG Liang, SHE Mei-hua, et al

(Institute of Cardiovascular Disease, Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To explore the effect of melatonin on the release of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and the activity of nuclear factor- κ B (NF- κ B) elicited by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** RAW264.7 macrophage were treated with ox-LDL alone or accompanied with different concentrations of melatonin, the level of TNF- α in cell culture supernatants was measured by ELISA, the level of nuclear pool of p65/NF- κ B protein was examined by Western blot for NF- κ B nuclear translocation analysis, and the DNA binding activity of NF- κ B was determined by EMSA. **Results** Melatonin inhibits the TNF- α release induced by ox-LDL, and melatonin also inhibits NF- κ B translocation and DNA binding activity. **Conclusions** The effect of melatonin blocked the release of the TNF- α was related to inhibiting the NF- κ B pathway.

Key words: Melatonin; ox-LDL; macrophage; TNF- α ; NF- κ B

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性进展的炎性疾病。由于巨噬细胞可吞噬氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)形成泡沫细胞并分泌大量的炎症细胞因子,因此巨噬细胞在 As 的发生和发展中起着关键作用^[1]。褪黑素

(melatonin, MT)是一种吲哚胺类神经内分泌激素,主要由哺乳动物和人类的松果体在夜间分泌,化学名称为 N-乙酰基-5-甲氧基色胺,MT 有着调节昼夜节律、睡眠、内分泌等多种重要的生理功能。研究发现 MT 在有抗氧化作用的同时,还具有显著的抗炎作

用^[2,3]。因此,本研究拟通过观察 MT 对 ox-LDL 诱发的巨噬细胞肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α)分泌的影响并初步分析其机制,为 MT 应用于动脉粥样硬化性疾病的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

MT (Sigma 公司); DMEM 培养基 (Gibco 公司); 胎牛血清 (Hyclone 公司); TNF- α ELISA 试剂盒 (R&D 公司); 细胞核蛋白抽提试剂盒、BCA 法蛋白定量试剂盒 (碧云天生物技术研究); p65/NF- κ B 抗体 (Cell Signaling Technology 公司); 增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 抗体 (Cell Signaling Technology 公司); EMSA 试剂盒 (Pierce 公司); 其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

健康人血浆购自衡阳市中心血站。先用超速离心法制备低密度脂蛋白,取部分用 10 μ mol/L Cu- SO_4 氧化修饰成 ox-LDL,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 细胞培养及分组

RAW 264.7 细胞为小鼠来源的巨噬细胞系,购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。用 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素) 于 95% O_2 、5% CO_2 、37 $^{\circ}$ C 条件下传代培养。处理细胞的 MT 浓度参考 Tamura 等^[4]报道的方法。将生长至 85% 汇合状态的细胞分成 5 组:(1)对照组;(2)50 mg/L ox-LDL 处理 2 h 组;(3)50 mg/L ox-LDL + 1 nmol/L MT 处理 2 h 组;(4)50 mg/L ox-LDL + 1 μ mol/L MT 处理 2 h 组;(5)50 mg/L ox-LDL + 10 μ mol/L MT 处理 2 h 组。

1.4 酶联免疫吸附测定检测 TNF- α 水平

按照酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒说明测定 RAW264.7 细胞上清液中 TNF- α 的浓度。

1.5 免疫印迹法检测 p65/NF- κ B 的核移位

按照细胞核蛋白抽提试剂盒说明提取各组细胞核蛋白,用 BCA 法进行蛋白质定量。取 30 μ g 蛋白进行 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转移至 PVDF 膜上,2% 牛血清白蛋白室温封闭 2 h,加入 p65/NF- κ B 抗体 (1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜,再加入辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 室温孵育 2 h, TBST 洗膜,增强型 ECL 试剂盒暗室曝光显影。以 PCNA 作为核蛋白内参照。

1.6 凝胶电泳迁移率分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) NF- κ B 与 DNA 的结合活性

将细胞传代贴壁 24 h,细胞生长到汇合率达到 70% ~ 80% 时,提取细胞核蛋白,BCA 法测定蛋白质浓度后置 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。采用生物素 3' 端标记法将 NF- κ B 探针 (5' - AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C - 3', 3' - TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G - 5') (上海博尚生物工程有限公司合成) 进行标记。将寡核苷酸探针变性退火成双链 (程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min,逐渐恢复至室温),12% PAGE 胶检验退火效果,稀释分装,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。后按 Pierce 公司 EMSA 试剂盒操作程序进行。

1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 褪黑素减少 ox-LDL 所致巨噬细胞 TNF- α 的释放

如图 1 所示:RAW264.7 细胞经 50 mg/L ox-LDL 处理 2 h 后,细胞培养上清液中的 TNF- α 浓度增加,与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$),而 ox-LDL + 不同浓度 (1 nmol/L、1 μ g/mL、10 μ mol/L) 的 MT 处理 2 h 后,TNF- α 浓度显著降低,与 ox-LDL 组比较差异均有显著性 ($P < 0.05$)。

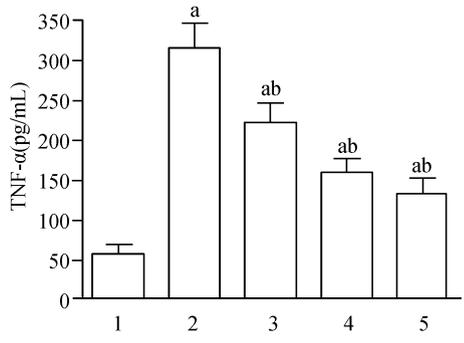


图 1 褪黑素减少 ox-LDL 所致的巨噬细胞肿瘤坏死因子 α 的释放

1:对照组;2:ox-LDL 组;3:ox-LDL + 1 nmol/L MT 组;4:ox-LDL + 1 μ mol/L MT 组;5:ox-LDL + 10 μ mol/L MT 组。与对照组比较,a; $P < 0.05$;与 ox-LDL 组比较,b; $P < 0.05$

2.2 褪黑素对核因子 κ B/p65 核移位的影响

如图 2 所示:RAW264.7 细胞经 50 mg/L ox-LDL 处理 2 h 后,NF- κ B/p65 核移位增加,较对照组

增加了 86.7% ; 而经不同浓度 (1 nmol/L、1 μg/mL、10 μmol/L) 的 MT 处理后, NF-κB/p65 核移位与 ox-LDL 组比较, 分别下降了 10.3%、37.6%、40.5% ($P < 0.05$)。

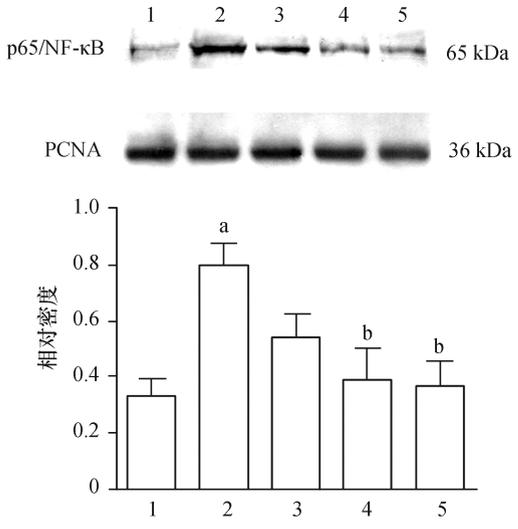


图2 褪黑素对核因子 κB/p65 核移位的影响

1: 对照组; 2: ox-LDL 组; 3: ox-LDL + 1 nmol/L MT 组; 4: ox-LDL + 1 μmol/L MT 组; 5: ox-LDL + 10 μmol/L MT 组. 与对照组比较, a: $P < 0.05$; 与 ox-LDL 组比较, b: $P < 0.05$

2.3 褪黑素对核因子 κB 与 DNA 结合活性的影响

由于 MT 能够减少 ox-LDL 诱发的巨噬细胞 TNF-α 的释放, 推测 MT 的这种效应是通过调节 NF-κB 的活性来实现的, 因此采用 EMSA 分析了 NF-κB 与靶基因启动子区 κB 位点的结合活性。结果如图 3 所示: 与对照组比较, RAW264.7 细胞经 50 mg/L ox-LDL 处理 2 h 后, NF-κB 与 DNA 的结合活性增强; 50 mg/L ox-LDL 分别加入 1 nmol/L、1 μg/mL、10 μmol/L MT 处理 RAW264.7 细胞 2 h 后, NF-κB 与 DNA 的结合活性逐渐降低, 说明 MT 能够减弱 ox-LDL 诱发的 NF-κB 的过度激活。

3 讨论

炎症在动脉粥样硬化的发病过程中扮演了重要的角色。动脉粥样斑块中已经发现激活的巨噬细胞、T 淋巴细胞及肥大细胞的存在^[5]。尤其在不稳定斑块中, 激活的免疫细胞大量聚集的现象更为突出。激活的巨噬细胞不仅分泌大量的促炎症因子, 引起内皮细胞促凝、抗凝及粘附分子的表达, 还能表达基质金属蛋白酶, 影响斑块的稳定性^[6]。另外,

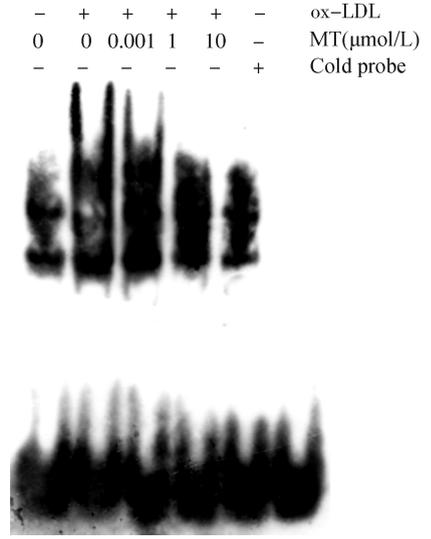


图3 凝胶电泳迁移率分析褪黑素对 NF-κB 与 DNA 结合活性的影响

大量的炎症因子还能够激活血液中的单核细胞, 并诱导其向动脉内膜迁移分化成泡沫细胞。文献[7]报道, 阻断炎症性信号通路中的关键分子 NF-κB 能够抑制细胞因子、组织因子和基质金属蛋白酶的产生, 这说明控制炎症反应有助于斑块的稳定。

褪黑素是一种主要由松果体分泌的神经内分泌激素, 具有调节免疫、抗氧化、抗炎等多种生物学功能。研究报道, 大鼠腹膜内注射 0.96 mg/kg LPS 可引起血清 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平的显著升高, 而同时注射 6 mg/kg MT 后, 血清 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平显著下降, 缓解了 LPS 诱发的炎症因子的大量释放^[8]。另外, 体外实验也证实 MT 能够显著降低 1 μg/mL LPS 诱发的人外周血单个核细胞 TNF 的释放^[9]。在这些研究的基础上, 本课题研究发现 MT 能够显著降低 50 mg/L ox-LDL 诱发的 RAW264.7 巨噬细胞 TNF-α 的释放。由于 NF-κB 是一种具有重要功能的核转录因子, 通常与抑制蛋白 (Inhibitor-κB, IκB) 结合成无活性的形式存在于胞质中, 当受到氧化剂、细菌、毒素、炎症因子的刺激后被激活, 经历快速磷酸化后 IκB 被非特异性蛋白酶水解, 从而使 NF-κB/p65 蛋白的核定位信号暴露, 导致 NF-κB 快速向胞核移位, 结合在被诱导基因启动子区 κB 位点, 启动基因的转录和蛋白的合成^[10]。由此可见, NF-κB/p65 的核移位是 NF-κB 激活的重要环节。那么, MT 减少 ox-LDL 诱发的巨噬细胞 TNF-α 的释放是否是通过调节 NF-κB 的活性来实现的呢? 因此, 本研究采用 Western blot 和 EMSA 技术分析了

NF- κ B/p65 的核移位及核因子 κ B 与靶基因启动子区 DNA 的结合活性。结果发现 50 mg/L ox-LDL 作用于 RAW264.7 巨噬细胞 2 h 后,细胞核 NF- κ B/p65 蛋白水平显著增加;并且 NF- κ B/p65 蛋白与 DNA 的结合活性增强,这说明 ox-LDL 通过激活 NF- κ B 增强了 TNF- α 的合成与释放;而与 50 mg/L ox-LDL 单独处理细胞 2 h 相比较,MT 能够减少细胞核 NF- κ B/p65 的蛋白水平并降低 NF- κ B 与靶基因启动子区 DNA 的结合活性,且这种作用呈剂量依赖性。因此,本研究结果说明 MT 可通过调节 NF- κ B 的活性减少 ox-LDL 诱发的 TNF- α 释放。

参考文献:

[1] Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention[J]. *Nat Med*, 2002, 8(11):1235-1242.

[2] Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages[J]. *J Neuroimmunol*, 2005, 165(1-2):139-149.

[3] Rezzani R, Porteri E, De Ciuceis C, et al. Effects of melatonin and

pycogenol on small artery structure and function in spontaneously hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 2010, 55(6):1373-1380.

- [4] Tamura EK, Cecon E, Monteiro AW, et al. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells[J]. *J Pineal Res*, 2009, 46(3):268-274.
- [5] De Boer OJ, Van Der Wal AC, Becker AE. Atherosclerosis, inflammation, and infection[J]. *J Pathol*, 2000, 190(3):237-243.
- [6] Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(12):1876-1890.
- [7] Monaco C, Andreacos E, Kiriakidis S, et al. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(15):5634-5639.
- [8] Nava F, Calapai G, Facciola G, et al. Melatonin effects on inhibition of thirst and fever induced by lipopolysaccharide in rat[J]. *Eur J Pharmacol*, 1997, 331(2-3):267-274.
- [9] Sacco S, Aquilini L, Ghezzi P, et al. Mechanism of the inhibitory effect of melatonin on tumor necrosis factor production in vivo and in vitro[J]. *Eur J Pharmacol*, 1998, 343(2-3):249-255.
- [10] Richmond A. Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(9):664-674.

(此文编辑 朱雯霞)