

热毒清对 HL-60 细胞产生分泌型肿瘤坏死因子 α 及肿瘤坏死因子 α 转换酶 mRNA 表达的影响*

王开富¹ 李鸣真¹ 杨渝珍² 韩玲² 丁廷波² 陆付耳¹

内容提要 目的:探讨纯中药制剂热毒清抑制肿瘤坏死因子 α (TNF α) 失控释放的分子机制。方法:采用细胞和分子生物学技术观察热毒清对 HL-60 细胞分泌炎症细胞因子——分泌型肿瘤坏死因子 α (sTNF α) 及肿瘤坏死因子 α 转换酶 (TACE) mRNA 表达的影响。结果:(1)1:30 稀释的热毒清能有效地控制内毒素脂多糖 (LPS) 刺激所引起的 sTNF α 的高分泌。(2)热毒清单独作用 HL-60 细胞时,对 TACE mRNA 的表达虽无明显的抑制作用,但对 LPS 刺激增加表达的 TACE mRNA 具有明显的抑制效果。结论:热毒清对 LPS 引起的炎症细胞因子 sTNF α 的分泌及对 sTNF α 激活的关键酶——TACE 的基因表达具有双重抑制作用,提示热毒清可能是一种 TACE 良好的天然抑制剂。

关键词 热毒清 HL-60 细胞 肿瘤坏死因子 α 转换酶 基因表达

Effect of Reduqing on HL-60 Cells in Secreting Tumor Necrosis Factor α Production and on TNF α Converting Enzyme mRNA Expression WANG Kai-fu, LI Ming-zhen, YANG Yu-zhen, et al *Institute of Integrated Traditional and Western Medicine, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Sciences and Technology, Wuhan (430030)*

Objective: To explore the molecular mechanism of inhibiting effects of Reduqing on the release of tumor necrosis factor α (TNF α). **Methods:** Using cytobiologic and molecular biologic technique to observe the effects of Reduqing on HL-60 cells in producing inflammatory cytokine secreting TNF α (sTNF α) and on mRNA expression of TNF α converting enzyme (TACE). **Results:** (1) Reduqing, diluted in ratio 1:30, could effectively inhibit the increased HL-60 production of sTNF- α induced by lipopolysaccharides (LPS); (2) Although no obvious effect on TACE was shown when Reduqing was applied alone on HL-60 cells, there was evident inhibitory effect of Reduqing on TACE mRNA expression enhancement induced by LPS. **Conclusion:** Reduqing could have the double inhibitory effects both on sTNF- α production and on the gene expression of its key enzyme, i. e. TACE stimulated by LPS, suggesting that it might be a hopeful and excellent natural TACE inhibitor.

Key words Reduqing, HL-60 cells, tumor necrosis factor α converting enzyme, gene expression

热毒清为纯中药注射液,内含金银花、大青叶、蒲公英和鱼腥草。我们长期的临床观察和实验研究证实,热毒清具有抗炎症、抗感染、抗病毒及抗内毒素等多种功效⁽¹⁾,能有效地改善 DIC 家兔炎症反应症状⁽²⁾。以往的研究表明热毒清的上述作用是通过抑制细胞因子的激活,降低如 TNF α 、IL-6、IL-8 等炎症细胞因子的毒性作用而为,但无足够的实验依据证明其降低这些细胞因子的机理所在。本实验进一步研究了热毒清对 HL-60 细胞产生 sTNF α 以及肿瘤坏死因子 α 转换酶 (TACE) 基因表达的影响,探讨其抑制炎症细胞因子的作用机理。

材料和方法

1 细胞株 HL-60 细胞、L929 细胞为本校实验医学中心分子生物室保存。

2 试剂 大肠杆菌内毒素 (LPS, Sigma 公司产品);MTT (华美公司产品);Trizol RNA 一次性提取试剂盒 (GIPCO/BRL);AMU 逆转录酶、dNTP、MgCl₂、TaqDNA 聚合物、RMPI-1640 培养基等为 Promega 产品;Oligo (dT)18 (中国科学院上海生物工程研究中心合成);PCR 引物 (于德国合成);佛波脂 (PMA, Sigma 公司产品)。

3 实验用药 100% 热毒清注射液 (由金银花、大青叶、鱼腥草、蒲公英等组成,每毫升含生药 1g) 由同济医学院中西医结合研究所研制。

* 国家自然科学基金重点项目 (No. 39630320) 之部分内容

1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所 (武汉 430030) 2. 华中科技大学同济医学院实验医学中心分子生物室

4 检测项目及方法 (1)细胞培养上清液中

sTNF α 活性检测:用浓度为 200ng/ml 的 LPS 刺激 HL-60 细胞(细胞密度为 1×10^5 /ml)于 6、12、24h(同时设立相应的对照组)收集不同时间的上清液, -20°C 保存待测其中 sTNF α 的活性。将生长状态良好的 L929 细胞消化后调节密度为 1×10^5 /ml, 加入 96 孔培养板, 每孔 100 μl , 作为检测 sTNF α 活性的靶细胞。贴壁培养 36h 后弃上清, 加入待测样品, 每孔 200 μl 继续培养 24h, 最终以 MTT(5mg/ml)显色, 酶标仪上测定 OD₅₇₀ 值, 详见文献⁽³⁾, sTNF α 的活性(细胞杀伤率)计算公式如下: 细胞杀伤率(%) = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

(2)热毒清对 HL-60 细胞分泌 sTNF α 的影响:将 LPS 溶解于 RMPI-1640 培养基中(浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) -20°C 储存备用。于密度为 $(1.0 \sim 2.0) \times 10^6$ /ml 的 HL-60 细胞中加入终浓度为 200ng/ml 的 LPS 共孵育 12h 后再分别加入 1:240、1:120、1:60、1:30 稀释的热毒清继续孵育, 并于 2、6、8h 各收集细胞上清进行 sTNF α 活性检测。(3)热毒清对 HL-60 细胞 TACE mRNA 表达的影响:将 1:30 稀释的热毒清与 1×10^6 /ml 的 HL-60 细胞共孵育 6h 后收集细胞总 RNA 进行逆转录 PCR, 检测 TACE cDNA 扩增产物, 其间以 RMPI-1640 液为空白对照、以 LPS 刺激为阳性对照;与 LPS 联合作用:用预先将终浓度为 200ng/ml 的 LPS 与 HL-60 细胞保温 6h 后再加入 1:30 稀释热毒清继续培养, 分别于 4、6h 两次收集细胞, 检测 TACE cDNA 扩增产物。(4)细胞中 TACE cDNA 扩增产物的检测:采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)扩增技术用 Trizol 试剂提取 HL-60 细胞总 RNA, 具体操作详见说明书, 所得 RNA 用紫外分光光度计检测并调整为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cDNA 第一链合成步骤按常规进行⁽⁴⁾, 最后将 20 μl 反应液于 94°C 变性 5min, 加入 80 μl 消毒水置 -70°C 保存;PCR 反应的引物 PY₅ 和 PY₆ 的序列为 PY₅ 5'-AG-CAATAAAGTTTGTGGGAA-3'; PY₆ 5'-CTTGCCAA-GATCCAAGCA-3', 该引物扩增的 DNA 片段对应于 TACE 所特有的解整合素(disintegrin)结构域。PCR 操作按《分子克隆实验指南》⁽⁴⁾方法进行, 循环 25 次: 94°C 52s, 55°C 50s, 72°C 45s, 反应产物为 297bp 的 DNA 条带。 β -微球蛋白(β -M)基因扩增条带为 120bp, 引物序列为: 5'-ACCCCCACTGAAAAAGA-3' 和 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'。

5 统计学方法 采用 t 检验进行差异显著性分析。 万方数据

结 果

1 LPS 刺激增加 HL-60 细胞膜表面 mTNF α 向 sTNF α 转换 LPS 刺激 6h 与同样处理的不加 LPS 的对照细胞比较, sTNF α 分泌增加不明显;刺激 12h 则增加明显($P < 0.05$);LPS 加入 24h 后, 虽然差别更大($P < 0.01$), 但需要排除细胞增殖的因素, 故 LPS 刺激 10~12h 为检测 TNF α 分泌及蛋白水解酶活性的最佳时间。

2 热毒清抑制 LPS 刺激引起的 sTNF α 的分泌和 TACE mRNA 的表达 见表 1。在 LPS 刺激 12h 后再加入热毒清共孵育 2、4、6、8h, 并以 PMA 为阳性对照, 不同时间 sTNF α 分泌量将随着保温时间的延长而增加, 同一时间的分泌量与加入热毒清的浓度有关, 其中以 1:30 稀释的浓度抑制效果最佳。RT-PCR 检测结果见图 1。由图 1b 可见在 LPS 刺激 6h 后加入 1:30 稀释的热毒清继续温育 4、6h, 与单一 LPS 刺激组比较热毒清明显抑制 LPS 刺激增强的 TACE mRNA 表达;图 1a 所示不经 LPS 刺激热毒清直接加入 HL-60 细胞培养液中共孵育 6h 的 RT-PCR 产物电泳图, 可见热毒清的抑制作用不十分明显, 但 LPS 的加强作用却非常明显。

表 1 热毒清抑制 HL-60 细胞的 mTNF α 向 sTNF α 转换的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	稀释度	sTNF α 活性(%)			
			2h	4h	6h	8h
LPS	6		13.2 $\pm$ 4.8	18.4 $\pm$ 1.5	30.8 $\pm$ 3.3	26.1 $\pm$ 3.5
LPS 加 PMA	6	(50ng/ml)	11.5 $\pm$ 3.5	26.3 $\pm$ 2.8	35.7 $\pm$ 1.7	36.4 $\pm$ 3.0
LPS 加热毒清	6	1:240	8.8 $\pm$ 2.0*	19.2 $\pm$ 14.0	23.0 $\pm$ 2.2	20.1 $\pm$ 1.5
	6	1:120	7.5 $\pm$ 4.3*	20.1 $\pm$ 1.5	18.6 $\pm$ 3.3	22.0 $\pm$ 1.5
	6	1:60	7.6 $\pm$ 3.4*	13.8 $\pm$ 1.5	12.6 $\pm$ 3.3	14.5 $\pm$ 2.6
	6	1:30	4.4 $\pm$ 1.5*	3.5 $\pm$ 0.4*	3.5 $\pm$ 0.5*	8.2 $\pm$ 3.5*

注:与 LPS 组比较, * $P < 0.01$

讨 论

炎症的始动因素可包括为感染性(内毒素血症)和非感染性(炎症细胞因子的释放)。LPS 在对细胞或组织损伤过程中仅是使效应细胞激活的“信号”, 其诱导效应细胞分泌过量的炎症细胞因子(TNF α 、IL-1、IL-6、IL-8), 参与炎症过程、介导病理损害是关键⁽⁵⁾。TNF α 是介导炎症反应的主要细胞因子, 在体液中出现高峰水平的时间较早^(6,7), 因此而倍受重视。Preze 等发现 TNF α 存在跨模型(mTNF α)和分泌型(sTNF α)两类。sTNF α 是由 mTNF α 的胞外部分经蛋白酶水解而释放至体液中的, 两者的关系实际为前体向成熟体转换的过程⁽⁸⁾。1997 年 Moss 等⁽⁹⁾从猪脾细

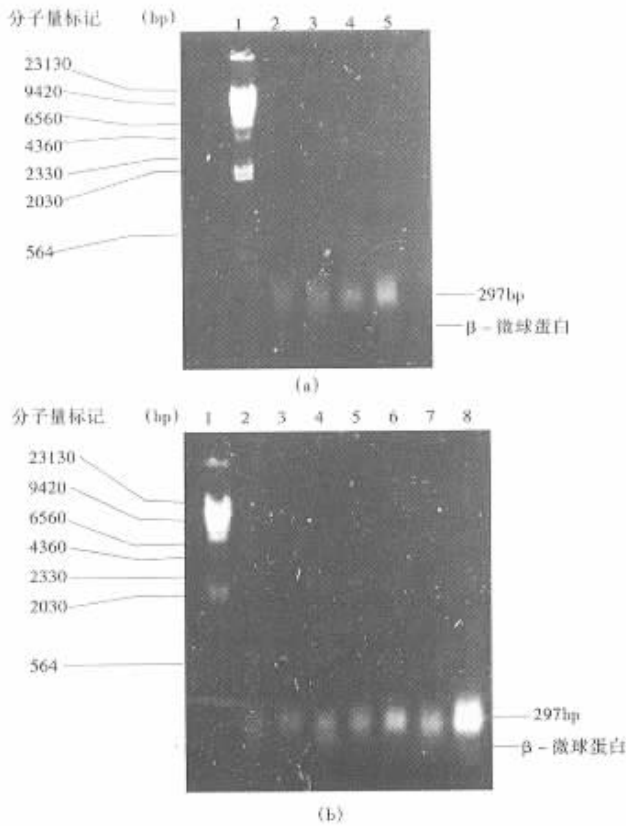


图 1 HL-60 细胞中 TACE mRNA 的 RT-PCR 扩增产物电泳图

注 图 a 为 LPS、PMA、热毒清直接刺激对 TACE mRNA 的影响:1 为 λ DNA/Hind III 分子量标记;2 为不加刺激物的对照组;3、4、5 分别为热毒清、PMA 和 LPS 的 6h 刺激组。图 b 为 LPS 刺激 6h 后,再加入不同调节物作用不同时间的扩增产物,1 为 λ DNA/Hind III 分子量标记;2、3 为加 PMA 再作用 6、4h;4、5 为加入热毒清后再作用 6、4h;6、7 为 LPS 连续刺激 12h 和 10h;8 为不加任何刺激物的对照组

胞中发现了 TNF α 转换酶即 TACE,指出:该酶能特异性水解 mTNF α 76 位丙氨酸与 77 位缬氨酸之间的肽键,从而释放含有 76 个氨基酸残基的 sTNF α 。由此可见,TACE 在 sTNF α 激活、分泌过程中起着关键作用,因此,对炎症机理的研究,TACE 属重要环节之一。切断 sTNF α 即降低或减少 sTNF α 是控制炎症反应的关键,至关重要。归根到底,筛选 TACE 有效抑制剂是控制炎症反应的途径之一。因此,有效地阻断上述因素之一即可防止以后出现的系列连锁反应。

本实验在体外模拟炎症过程,将 200ng/ml 的 LPS 与 HL-60 细胞共孵育 12h 后检测细胞培养上清中的 sTNF α 的活性。由表 1 可知,与不加刺激物的对照组

比较,LPS 能显著性地增加 sTNF α 的分泌,同时还增强细胞对 TACE mRNA 的表达,与对照组比较,刺激 2、6h 时 297bp 的 DNA 扩增产物条带明显深染,10h 达高峰,12h 后开始减弱(图 1a、b)。实验结果表明 LPS 对炎症细胞因子 sTNF α 分泌及对产生 sTNF α 的关键酶——TACE 的 mRNA 表达均具有促进作用。当将清热解毒之中药热毒清以 1:30 稀释浓度加入 LPS 刺激 12h 后的 HL-60 细胞培养液中时,培养上清中 sTNF α 的活性显著性下降,且 297bp DNA 扩增条带明显浅染,表明热毒清对 LPS 刺激引起的 sTNF α 的分泌及 TACE mRNA 的高表达具有强效的抑制作用。

以往的研究表明,热毒清对内毒素性 DIC 家兔细胞或组织损伤具有保护作用,是通过抑制炎症细胞因子的激活、降低如 TNF α 、IL-6、IL-8 等细胞因子的过度释放而实现的。本实验进一步从分子水平证明热毒清抑制 sTNF α 的分泌的作用机理,在于其对抗了 LPS 诱导的 TACE mRNA 的高表达。因此,热毒清作为 TACE 有效的天然抑制物已被实验证实,作为新型的抗炎药物值得迅速开发和应用。

参 考 文 献

1. 李鸣真,叶望云,林菊生,等. 中医清法制剂热毒清抗内毒素的实验研究. 同济医科大学学报 1989;28(2):87—90.
2. 吴朝栋,李鸣真,张艳萍,等. 中药热毒清对内毒素 DIC 家兔血浆肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素-6 水平影响的研究. 中国中西医结合杂志 1995;15(6):356—358.
3. 丁传林,姚 堃,周瑶玺. GM-CSF 和 IFN- γ 联合刺激人 PBMC 产生 TNF α . 免疫学杂志 1994;10(2):109—112.
4. 萨姆布鲁克 EF,弗里奇 T,曼尼柯蒂斯等编著. 分子克隆实验指南. 北京:科学出版社,1992:362.
5. Detener MA, Bazil V, Von Asmuth EJU, et al. Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α , IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. J Immunol 1993;150(3):2885—2888.
6. Shapero L, Gelfand JA. Cytokine and sepsis pathophysiology and therapy. New Uorezons 1993;1(1):13—15.
7. 雪 琳. SIRS 和 MODS 防治新对策的实验研究. 中国危重病急救医学 1997;9(12):720—723.
8. Kim KU. Pro-tumour necrosis factor cleavage enzyme in macrophage membrane/particulate. Immunology 1993;80(2):134—139.
9. Moss ML. Cloning of a disintegrin metalloproteingase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . Nature 1997;385(6):733—736.