

中性粒细胞颗粒蛋白对脂多糖诱导巨噬细胞生成一氧化氮的影响

王静¹ 田李星² 陶丽¹ 孙春红¹ 梁华平² 闫柏刚¹

¹重庆医科大学附属第三医院急诊科,重庆 401120; ²陆军军医大学陆军特色医学中心战伤感染与特需药品研究室,重庆 400042

通信作者: 闫柏刚, Email: 798239967@qq.com

【摘要】 **目的** 探讨中性粒细胞颗粒蛋白(NGP)对脂多糖(LPS)诱导巨噬细胞生成一氧化氮(NO)的影响及其调控机制。**方法** 体外培养 NGP 高表达小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 细胞(NGP/RAW)、阴性对照空载体 RAW264.7 细胞(NC/RAW)、NGP 敲除 RAW264.7 细胞(NGP KO/RAW)和野生型 RAW264.7 细胞(WT/RAW), 取对数生长期细胞分别给予 10 mg/L 的 LPS(LPS 组)或磷酸盐缓冲液(PBS 组)进行刺激。用 Griess 方法检测上清中 NO 含量;用定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的 mRNA 表达;用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 iNOS 蛋白及磷酸化转录激活因子 1(p-STAT1)蛋白表达。**结果** 与 PBS 组相比,在 LPS 刺激后各时间点,4 组细胞中 iNOS mRNA 表达和 NO 产生量均明显增加, iNOS mRNA 表达于 LPS 刺激后 12 h 达峰值($2^{-\Delta\Delta Ct}$: NC/RAW 细胞为 38.45 ± 1.34 比 1.00 ± 0.00 , NGP/RAW 细胞为 56.24 ± 2.41 比 1.45 ± 0.30 , WT/RAW 细胞为 37.84 ± 1.52 比 1.00 ± 0.00 , NGP KO/RAW 细胞为 5.47 ± 0.62 比 0.98 ± 0.40 , 均 $P < 0.05$), NO 产生量于 LPS 刺激后 24 h 达峰值($\mu\text{mol/L}$: NC/RAW 细胞为 24.15 ± 1.26 比 0.15 ± 0.04 , NGP/RAW 细胞为 58.80 ± 2.11 比 0.18 ± 0.02 , WT/RAW 细胞为 25.04 ± 1.80 比 0.16 ± 0.02 , NGP KO/RAW 细胞为 2.42 ± 0.38 比 0.12 ± 0.03 , 均 $P < 0.05$)。给予 LPS 刺激后, NGP/RAW 细胞内 iNOS mRNA 表达和 NO 生成量较 NC/RAW 细胞明显增加[iNOS mRNA($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2 h 为 8.42 ± 0.59 比 4.63 ± 0.37 , 6 h 为 27.16 ± 1.60 比 14.25 ± 1.02 , 12 h 为 56.24 ± 2.41 比 38.45 ± 1.34 ; NO($\mu\text{mol/L}$): 6 h 为 4.12 ± 0.25 比 2.23 ± 0.17 , 12 h 为 16.50 ± 1.52 比 6.35 ± 0.39 , 24 h 为 58.80 ± 2.11 比 24.15 ± 1.26 , 均 $P < 0.05$];同时, p-STAT1 和 iNOS 蛋白表达明显增强(p-STAT1/GAPDH: 0 h 为 4.26 ± 1.84 比 1.00 ± 0.32 , 2 h 为 20.59 ± 4.97 比 0.93 ± 0.21 , 6 h 为 141.99 ± 10.99 比 11.17 ± 2.11 ; iNOS/GAPDH: 0 h 为 1.27 ± 0.86 比 1.00 ± 0.22 , 2 h 为 7.94 ± 1.94 比 2.01 ± 0.92 , 6 h 为 24.24 ± 4.88 比 3.72 ± 1.11 , 均 $P < 0.05$),说明 NGP 可以通过促进转录激活因子 1(STAT1)通路磷酸化来增加 iNOS 表达,进而使 NO 生成增多。LPS 刺激后, NGP KO/RAW 细胞内 iNOS mRNA 表达和 NO 生成量较 WT/RAW 细胞明显减少[iNOS mRNA($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2 h 为 2.46 ± 0.31 比 4.22 ± 0.18 , 6 h 为 3.61 ± 0.44 比 13.02 ± 1.34 , 12 h 为 5.47 ± 0.62 比 37.84 ± 1.52 ; NO($\mu\text{mol/L}$): 6 h 为 1.22 ± 0.19 比 2.01 ± 0.12 , 12 h 为 1.60 ± 0.44 比 5.15 ± 0.62 , 24 h 为 2.42 ± 0.38 比 25.04 ± 1.80 , 均 $P < 0.05$]。说明 NGP 敲除后 iNOS 活化减少,进而使 NO 生成减少。**结论** NGP 可通过激活 STAT1/iNOS 通路正向调控活化巨噬细胞中 NO 的生成。

【关键词】 中性粒细胞颗粒蛋白; 巨噬细胞; 脂多糖; 诱导型一氧化氮合酶; 一氧化氮

基金项目: 国家自然科学基金(81871612);军队生物安全研究专项(19SWAQ18)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200925-00651

Effects of neutrophilic granule protein on nitric oxide production in lipopolysaccharide-induced macrophages

Wang Jing¹, Tian Lixing², Tao Li¹, Sun Chunhong¹, Liang Huaping², Yan Baigang¹

¹Department of Emergency, the Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401120, China;

²Department of Wound Infection and Drug, Army Medical Center, Army Medical University, Chongqing 400042, China

Corresponding author: Yan Baigang, Email: 798239967@qq.com

【Abstract】 **Objective** To explore the influences of neutrophilic granule protein (NGP) on nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophages and the regulatory mechanism. **Methods** NGP high-expression RAW264.7 cells (NGP/RAW) and negative control empty vector cells (NC/RAW), NGP knockout RAW264.7 cells (NGP KO/RAW) and wild-type cells (WT/RAW) were cultured *in vitro*. Cells in logarithmic phase were stimulated with 10 mg/L LPS (LPS group) or phosphate buffered saline (PBS group) respectively. The content of NO in the supernatant was detected by Griess method. The mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) was detected by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR). The protein expressions of iNOS and phosphorylated signal transducer and activator of transcription 1 (p-STAT1) were detected by Western blotting. **Results** Compared with PBS group, iNOS mRNA and NO expression were significantly increased at different time after LPS stimulation, the mRNA expression of iNOS peaked at 12 hours after LPS stimulation ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 38.45 ± 1.34 vs. 1.00 ± 0.00 in NC/RAW cells, 56.24 ± 2.41 vs. 1.45 ± 0.30 in NGP/RAW cells, 37.84 ± 1.52 vs. 1.00 ± 0.00 in WT/RAW cells, 5.47 ± 0.62 vs. 0.98 ± 0.40 in NGP KO/RAW cells, all $P < 0.05$), and the production

of NO peaked at 24 hours after LPS stimulation ($\mu\text{mol/L}$: 24.15 ± 1.26 vs. 0.15 ± 0.04 in NC/RAW cells, 58.80 ± 2.11 vs. 0.18 ± 0.02 in NGP/RAW cells, 25.04 ± 1.80 vs. 0.16 ± 0.02 in WT/RAW cells, 2.42 ± 0.38 vs. 0.12 ± 0.03 in NGP KO/RAW cells, all $P < 0.05$). After being stimulated by LPS, the expression of iNOS mRNA and NO in NGP/RAW cells were increased significantly compared with NC/RAW cells [iNOS mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 8.42 ± 0.59 vs. 4.63 ± 0.37 at 2 hours, 27.16 ± 1.60 vs. 14.25 ± 1.02 at 6 hours, 56.24 ± 2.41 vs. 38.45 ± 1.34 at 12 hours; NO ($\mu\text{mol/L}$): 4.12 ± 0.25 vs. 2.23 ± 0.17 at 6 hours, 16.50 ± 1.52 vs. 6.35 ± 0.39 at 12 hours, 58.80 ± 2.11 vs. 24.15 ± 1.26 at 24 hours, all $P < 0.05$]. At the same time, the protein expressions of p-STAT1 and iNOS were also significantly enhanced (p-STAT1/GAPDH: 4.26 ± 1.84 vs. 1.00 ± 0.32 at 0 hours, 20.59 ± 4.97 vs. 0.93 ± 0.21 at 2 hours, 141.99 ± 10.99 vs. 11.17 ± 2.11 at 6 hours; iNOS/GAPDH: 1.27 ± 0.86 vs. 1.00 ± 0.22 at 0 hours, 7.94 ± 1.94 vs. 2.01 ± 0.92 at 2 hours, 24.24 ± 4.88 vs. 3.72 ± 1.11 at 6 hours, all $P < 0.05$), indicating that NGP might increase the expression of iNOS by promoting the phosphorylation of the signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) pathway, thereby increasing the production of NO. After being stimulated by LPS, the expression of iNOS mRNA and NO in NGP KO/RAW cells were significantly lower than that of WT/RAW cells [iNOS mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.46 ± 0.31 vs. 4.22 ± 0.18 at 2 hours, 3.61 ± 0.44 vs. 13.02 ± 1.34 at 6 hours, 5.47 ± 0.62 vs. 37.84 ± 1.52 at 12 hours; NO ($\mu\text{mol/L}$): 1.22 ± 0.19 vs. 2.01 ± 0.12 at 6 hours, 1.60 ± 0.44 vs. 5.15 ± 0.62 at 12 hours, 2.42 ± 0.38 vs. 25.04 ± 1.80 at 24 hours, all $P < 0.05$]. It showed that iNOS activation was reduced after NGP knockout, which in turn reduced NO production. **Conclusion** NGP can positively regulate NO production in activated macrophages by activating the STAT1/iNOS pathway.

【Key words】 Neutrophilic granule protein; Macrophage; Lipopolysaccharide; Inducible nitric oxide synthase; Nitric oxide

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81871612); Biosecurity Specialized Project of PLA (19SWAQ18)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200925-00651

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种活性高、不稳定的小分子气体,它对维护正常的细胞功能至关重要^[1]。在生理状态下,NO不仅是重要的神经递质,还可以调节血管舒缩功能、减少血栓形成、清除自由基等。但在病理情况下,NO是介导免疫过程和炎症反应的重要炎性因子^[2]。一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)是合成NO的关键限速酶,有3种亚型,包括神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)^[3],其中iNOS主要位于巨噬细胞、白细胞和炎症区上皮细胞^[4]。巨噬细胞是机体固有免疫重要组成细胞,在促炎介质刺激下巨噬细胞可通过激活iNOS产生大量NO,大量的NO有助于抵御入侵的病原体;但另一方面,NO浓度过高可能会产生毒性效应,并与包括脓毒性休克、心功能不全、疼痛、糖尿病和癌症在内的多种疾病有关^[5-6]。鉴于NO的双重作用,精细调控NO的表达水平,使其更好地发挥细胞保护作用,同时控制细胞毒性作用具有重要意义。

中性粒细胞颗粒蛋白(neutrophilic granule protein, NGP)最初在未成熟的骨髓细胞和早幼粒细胞中被发现,这种髓样颗粒蛋白具有1160个碱基序列,编码167个氨基酸,相对分子质量约为19330^[7]。进一步的序列分析发现,NGP存在1个N端糖基化位点和4个保守半胱氨酸残基,与抗菌肽有30%的相似性,属于半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家

族(cystatin)^[8]。Cystatin超家族是一类天然的半胱氨酸蛋白酶抑制剂,广泛分布在各种生物体中,包括原生动物、植物、真菌以及病毒^[9]。已有研究证实,cystatin可通过调控细胞因子分泌参与炎症过程的多个环节^[10]。有实验显示,从鸡中提取的胱抑素可以上调 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)激活的小鼠腹腔巨噬细胞产生大量NO,同时提高白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)、降低IL-4水平,并增强对寄生虫生长的抑制作用^[11]。同样,捻转血矛线虫来源的重组半胱氨酸蛋白酶抑制剂3(recombinantcystatin-3 from Haemonchus contortus, rHCcyst-3)也可显著增强脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激的山羊单核细胞NO的产生^[12]。但是NGP作为cystatin超家族的一员,对LPS诱导时巨噬细胞生成NO的影响鲜见报道。本研究旨在探讨NGP高表达/敲除时对LPS诱导巨噬细胞生成NO的影响及其可能参与的机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂: RPMI 1640培养基、胎牛血清、青-链霉素双抗均从美国Gibco公司获得;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)从武汉博士德生物工程有限公司获得;LPS纯品粉末从美国Sigma公司获得;NGP、iNOS引物购自上海生工生物工程有限公司;iNOS抗体和信号转导与转录激活因子1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)抗体均从美国Cell Signaling Technology公司获得。

1.2 实验细胞来源:NGP 高表达小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 细胞(NGP/RAW)、阴性对照空载体 RAW264.7 细胞(NC/RAW)、NGP 敲除 RAW264.7 细胞(NGP KO/RAW)均购于赛业生物科技有限公司;野生型 RAW264.7 细胞(WT/RAW)由本实验室提供。NGP/RAW 细胞株构建方法:将细胞按每孔 $(2.5 \sim 3.5) \times 10^5$ 个接种至 6 孔板,每孔加入 2 mL 完全培养基。将细胞置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、 95% 相对湿度的培养箱中培养 $18 \sim 24$ h;取对数生长期细胞进行计数,然后进行转导,先更换为 1 mL 新鲜完全培养基,将慢病毒溶解后吹打混匀,根据病毒滴度和细胞最适感染复数加入慢病毒,然后继续置于培养箱中培养;根据细胞状态选择转导时间,转导 48 h 后拍照,于荧光显微镜下观察转染效果;最后按照质粒对应筛选基因,对转导后的细胞及未转导病毒的空白细胞组更换为含一定浓度筛选药物的完全培养基进行药筛,当空白细胞组细胞基本被杀死,剩下的即为稳转株细胞。NGP KO/RAW 细胞株构建方法:首先构建向导 RNA(guide RNA, gRNA)载体,然后将 gRNA 和 CRISPR 相关核酸酶-9(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated system, CRISPR-Cas9)体外转录成 mRNA,用电转仪电转使 mRNA 进入细胞,将获得的细胞进行单克隆筛选。

1.3 伦理学:本实验符合相关伦理要求,经陆军军医大学陆军特色医学中心审批(审批号:20200318)。

1.4 实验设计及实验分组:采用完全随机设计。

1.4.1 NGP 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞中 iNOS 表达及 NO 生成的影响:将上述 4 种细胞进行培养,取对数生长期细胞进行实验。细胞计数后铺板,保持每个 6 孔板中细胞数约为 2.0×10^6 个。每种 RAW 细胞分为 LPS 组和对照组,待细胞稳定贴壁 2 h 后加药刺激,LPS 组每孔加入 10 mg/L 的 LPS,对照组则加入等体积 PBS;设置药物刺激时间点为 0、2、6、12、24 h。使用 NO 检测试剂盒检测上清中 NO 表达量;用 TRIzol 收集细胞至无 RNA 酶的离心管中,用定量反转录-聚合酶链反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测 iNOS mRNA 表达;采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 iNOS 蛋白表达。

1.4.2 NGP 通过何种通路调控 LPS 诱导 RAW264.7 细胞中 NO 的合成:将 NGP/RAW 细胞及 NC/RAW 细胞按上述方法接种于 6 孔板,稳定贴壁后每孔分别加入 10 mg/L 的 LPS(LPS 组)或等体积的 PBS

(对照组);设置刺激时间点为 0、2、6 h。收集细胞团块,用 Western blotting 检测细胞中磷酸化 STAT1(phosphorylation STAT1, p-STAT1)蛋白表达。

1.5 指标检测方法

1.5.1 RT-qPCR:提取细胞 RNA,用 1 mL TRIzol 收集的样本加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡后在室温下孵育 3 min, 4°C 下 $12\,000 \text{ r/min}$ (离心半径 82 mm)离心 10 min,取 $450 \mu\text{L}$ 上层液体于无 RNA 酶的离心管中,加入等体积 70% 乙醇,离心后弃掉废液。先后加入漂洗液和去蛋白液并离心,最后加入 $20 \sim 30 \mu\text{L}$ 无 RNA 酶水,定量后取 $1 \mu\text{g}$ RNA 反转录为 cDNA,然后进行扩增,使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行荧光定量分析。

1.5.2 Western blotting:每孔先用 PBS 洗涤,待 PBS 完全吸净后每孔加 $200 \mu\text{L}$ RIPA 细胞裂解液[RIPA:蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)为 $100:1$],刮取细胞后冰上放置 15 min,中途涡旋 5 s; 4°C 下 $12\,000 \text{ r/min}$ (离心半径 82 mm)离心 10 min,取 $160 \mu\text{L}$ 上清置于提前预冷的离心管中,加入 $40 \mu\text{L}$ 上样缓冲液, 100°C 水浴 10 min;取 $30 \mu\text{L}$ 上样,经电泳、切膜、封闭,摇床放置 1.5 h,然后孵育一抗, 4°C 摇床过夜;次日常温放置在摇床上孵育二抗 1 h,用化学发光法曝光,Image J 软件分析目的蛋白灰度值,以目的蛋白与内参 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的灰度值比值表示目的蛋白表达量。

1.5.3 NO 检测:使用 NO 检测试剂盒(Griess 方法)检测 NO。先将收集的细胞上清涡旋混匀,然后按每孔 $50 \mu\text{L}$ 依次加入标准品、细胞上清、Griess 试剂 I、Griess 试剂 II 到 96 孔板中。使用美国 Bio-Tek 公司的酶标仪读取吸光度,波长选择为 570 nm 。用测定的标准品亚硝酸钠溶液的吸光度制作标准曲线,最后利用标准曲线和各上清的吸光度值计算 NO 浓度。

1.6 统计学分析:每次实验至少重复 3 次,使用 SPSS 25.0 软件对数据进行整理、分析。符合正态分布的定量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NGP 高表达促进 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 iNOS 和 NO 的表达(表 1):与 PBS 组相比,在 LPS 刺激后各时间点 NC/RAW 和 NGP/RAW 细胞中 iNOS mRNA 表达和 NO 生成量均明显增加(均 $P <$

表1 NGP高表达对LPS刺激小鼠巨噬细胞株RAW264.7细胞后不同时间点iNOS和NO表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量 (孔)	iNOS mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)			NO ($\mu\text{mol/L}$)		
		2 h	6 h	12 h	6 h	12 h	24 h
NC/RAW+PBS组	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	0.08±0.01	0.12±0.02	0.15±0.04
NC/RAW+LPS组	3	4.63±0.37 ^a	14.25±1.02 ^a	38.45±1.34 ^a	2.23±0.17 ^a	6.35±0.39 ^a	24.15±1.26 ^a
NGP/RAW+PBS组	3	1.08±0.15	1.24±0.21	1.45±0.30	0.09±0.02	0.14±0.03	0.18±0.02
NGP/RAW+LPS组	3	8.42±0.59 ^{bc}	27.16±1.60 ^{bc}	56.24±2.41 ^{bc}	4.12±0.25 ^{bc}	16.50±1.52 ^{bc}	58.80±2.11 ^{bc}

注:NGP为中性粒细胞颗粒蛋白,LPS为脂多糖,RAW264.7细胞为小鼠巨噬细胞株,iNOS为诱导型一氧化氮合酶,NO为一氧化氮,NC/RAW为阴性对照空载体RAW264.7,PBS为磷酸盐缓冲液,NGP/RAW为NGP高表达RAW264.7;与NC/RAW+PBS组比较,^a $P<0.05$;与NGP/RAW+PBS组比较,^b $P<0.05$;与NC/RAW+LPS组比较,^c $P<0.05$

表2 NGP敲除对LPS刺激小鼠巨噬细胞株RAW264.7细胞后不同时间点iNOS和NO表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量 (孔)	iNOS mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)			NO ($\mu\text{mol/L}$)		
		2 h	6 h	12 h	6 h	12 h	24 h
WT/RAW+PBS组	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	0.07±0.01	0.14±0.01	0.16±0.02
WT/RAW+LPS组	3	4.22±0.18 ^a	13.02±1.34 ^a	37.84±1.52 ^a	2.01±0.12 ^a	5.15±0.62 ^a	25.04±1.80 ^a
NGP KO/RAW+PBS组	3	0.86±0.22	0.91±0.34	0.98±0.40	0.06±0.01	0.09±0.02	0.12±0.03
NGP KO/RAW+LPS组	3	2.46±0.31 ^{bc}	3.61±0.44 ^{bc}	5.47±0.62 ^{bc}	1.22±0.19 ^{bc}	1.60±0.44 ^{bc}	2.42±0.38 ^{bc}

注:NGP为中性粒细胞颗粒蛋白,LPS为脂多糖,RAW264.7细胞为小鼠巨噬细胞株,iNOS为诱导型一氧化氮合酶,NO为一氧化氮,WT/RAW为阴性对照RAW264.7,PBS为磷酸盐缓冲液,NGP KO/RAW为NGP敲除RAW264.7;与WT/RAW+PBS组比较,^a $P<0.05$;与NGP KO/RAW+PBS组比较,^b $P<0.05$;与WT/RAW+LPS组比较,^c $P<0.05$

表3 NGP高表达对LPS刺激小鼠巨噬细胞株RAW264.7细胞后不同时间点p-STAT1和iNOS表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量 (孔)	p-STAT1/GAPDH			iNOS/GAPDH		
		0 h	2 h	6 h	0 h	2 h	6 h
NC/RAW+LPS组	3	1.00±0.32	0.93±0.21	11.17±2.11	1.00±0.22	2.01±0.92	3.72±1.11
NGP/RAW+LPS组	3	4.26±1.84 ^a	20.59±4.97 ^a	141.99±10.99 ^a	1.27±0.86 ^a	7.94±1.94 ^a	24.24±4.88 ^a

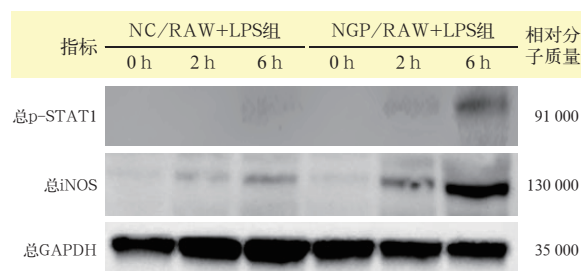
注:NGP为中性粒细胞颗粒蛋白,LPS为脂多糖,RAW264.7细胞为小鼠巨噬细胞株,p-STAT1为磷酸化转录激活因子1,iNOS为诱导型一氧化氮合酶,NC/RAW为阴性对照空载体RAW264.7,NGP/RAW为NGP高表达RAW264.7,GAPDH为3-磷酸甘油醛脱氢酶;与NC/RAW+LPS组比较,^a $P<0.05$

0.05)。给予LPS诱导2、6、12 h,iNOS mRNA表达在NGP/RAW细胞中明显高于NC/RAW细胞(均 $P<0.05$),且在12 h达高峰。与此对应的是,LPS诱导6、12、24 h,NO生成量在NGP/RAW细胞中也明显多于NC/RAW细胞(均 $P<0.05$),且在24 h达高峰。说明NGP正向调控了活化巨噬细胞NO的生成。

2.2 NGP敲除降低LPS诱导的RAW264.7细胞中iNOS和NO的表达(表2):与PBS组相比,在LPS刺激后各时间点WT/RAW细胞和NGP KO/RAW细胞中iNOS mRNA表达及NO生成量均明显增加(均 $P<0.05$)。LPS诱导2、6、12 h,iNOS mRNA表达在NGP KO/RAW细胞中明显低于WT/RAW细胞(均 $P<0.05$)。与此相应的是,LPS诱导6、12、24 h时,NO生成量在NGP KO/RAW细胞中也明显少于WT/RAW细胞(均 $P<0.05$)。说明NGP对LPS诱导巨噬细胞NO的生成具有调控作用。

2.3 NGP高表达增强LPS诱导RAW264.7细胞中STAT1磷酸化和iNOS表达(图1;表3):给予LPS诱导后,NGP/RAW细胞中p-STAT1表达水平明显高于NC/RAW细胞,同时iNOS蛋白表达也明显增

加(均 $P<0.05$)。说明NGP可以通过促进STAT1通路磷酸化增加iNOS的表达和NO的生成。



NC/RAW为阴性对照空载体小鼠巨噬细胞株RAW264.7,NGP/RAW为中性粒细胞颗粒蛋白(NGP)高表达小鼠巨噬细胞株RAW264.7,STAT1为信号转导与转录激活因子1,iNOS为诱导型一氧化氮合酶,p-STAT1为磷酸化STAT1,GAPDH为3-磷酸甘油醛脱氢酶

图1 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测脂多糖(LPS)刺激不同时间点NC/RAW和NGP/RAW细胞中STAT1/iNOS通路蛋白表达

3 讨论

本课题组前期研究发现,在金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、大肠杆菌或LPS诱导的小鼠腹腔巨噬细胞中NGP均有高表达;给予LPS诱导后,NGP可促进巨噬细胞中IL-10表达并抑制

IL-1 β 和肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 表达^[13], 说明 NGP 可能通过调控多种炎症因子合成, 从而参与炎症反应, 但其对 NO 的影响尚不明确。

炎症刺激下, 巨噬细胞产生的 NO 有助于清除病原体, 但是 NO 浓度过高又会产生毒性效应^[14]。许多研究表明, 过量的 NO 参与了脓毒症的发生发展过程, 例如: 由内毒素血症和细胞因子引起的小鼠休克模型中, 高 NO 的产生会导致血管扩张、低血压及心血管功能障碍^[15]; 此外, 在脓毒症后急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 患者的肺巨噬细胞中 iNOS 活性增加, NO 生成增加, 从而使呼吸屏障进一步被破坏^[16]。因此对于 NO 这把“双刃剑”, 如何通过精细调控 NO 生成, 使其发挥正常生理作用的同时控制其有害效应十分重要。本研究显示, 给予 LPS 诱导后, NGP/RAW 细胞中 NO 的生成量明显增加, NGP 敲除后则可减少 NO 生成, 说明 NGP 与 cystatin 超家族的其他成员一样可以调控巨噬细胞中 NO 的表达。

iNOS 是合成 NO 的关键限速酶, 有研究显示, cystatin C 增加 NO 生成的作用依赖于 iNOS 通路的激活, 因为加入特定的 iNOS 抑制剂 L-单甲基精氨酸 (L-NG-monomethyl-arginine, L-NMMA) 后该作用几乎完全消失^[10]。目前已有研究证实对 iNOS 转录阶段的调控是控制 iNOS 表达最重要的机制, iNOS 主要的转录因子有 STAT1、核转录因子 - κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 等^[17]。奥拉齐酮是一种新型的免疫调节药, 其通过降低巨噬细胞中炎症转录因子 NF- κ B 和 STAT1 的活化, 抑制 iNOS 的表达及 NO 的产生, 从而在哮喘和炎症性肠病实验模型中发挥抗炎特性^[18]。在本课题组前期研究中发现, 给予 LPS 刺激后, NGP 高表达会抑制巨噬细胞中 NF- κ B 的激活^[13], 提示 NGP 对 iNOS 的正向调节作用并不通过增强 NF- κ B 活性而介导。本实验首先证明了 NGP 对 NO 具有调节作用, 接着探索了 iNOS 和 STAT1 的表达情况。结果显示, 给予 LPS 诱导后, NGP 高表达可以明显促进巨噬细胞中 STAT1 的磷酸化, 也就是说 NGP 可通过 STAT1 通路参与调控 iNOS 的表达。

综上所述, 本研究显示, 给予 LPS 诱导后, NGP 高表达可通过激活 STAT1/iNOS 通路正向调控活化巨噬细胞中 NO 的生成; 而 NGP 敲除后 iNOS 活化减少, NO 生成减少。STAT1/iNOS 是一条调控活化

巨噬细胞 NO 合成的新通路, 为以后合理调节炎症反应时 NO 的生成水平、从而更好地调控脓毒症的病理状态提供了新的方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lind M, Hayes A, Caprnda M, et al. Inducible nitric oxide synthase: good or bad? [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93: 370-375. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.036.
- [2] 林海珊, 欧敏. 诱导型一氧化氮合成酶及其相关分子的研究进展 [J]. 现代医学, 2015, 43 (5): 644-647. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7562.2015.05.033.
Lin HS, Ou M. Research progress of inducible nitric oxide synthase and its related molecules [J]. Modern Med J, 2015, 43 (5): 644-647. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7562.2015.05.033.
- [3] Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition [J]. Biochem J, 2001, 357 (Pt 3): 593-615. DOI: 10.1042/0264-6021:3570593.
- [4] 李园园, 徐文清. 诱导型一氧化氮合成酶抑制剂的研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2017, 27 (6): 477-489. DOI: 10.14142/j.cnki.cn21-1313/r.2017.06.010.
Li YY, Xu WQ. Advances in the study of inducible nitric oxide synthase inhibitors [J]. Chin J Med Chemistry, 2017, 27 (6): 477-489. DOI: 10.14142/j.cnki.cn21-1313/r.2017.06.010.
- [5] Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases [J]. Inflammopharmacology, 2007, 15 (6): 252-259. DOI: 10.1007/s10787-007-0013-x.
- [6] Cinelli MA, Do HT, Miley GP, et al. Inducible nitric oxide synthase: regulation, structure, and inhibition [J]. Med Res Rev, 2020, 40 (1): 158-189. DOI: 10.1002/med.21599.
- [7] Moscinski LC, Hill B. Molecular cloning of a novel myeloid granule protein [J]. J Cell Biochem, 1995, 59 (4): 431-442. DOI: 10.1002/jcb.240590404.
- [8] Boutté AM, Friedman DB, Bogoy M, et al. Identification of a myeloid-derived suppressor cell cystatin-like protein that inhibits metastasis [J]. FASEB J, 2011, 25 (8): 2626-2637. DOI: 10.1096/fj.10-180604.
- [9] Kopitar-Jerala N. Innate immune response in brain, NF- κ B signaling and cystatins [J]. Front Mol Neurosci, 2015, 8: 73. DOI: 10.3389/fnmol.2015.00073.
- [10] Zi M, Xu Y. Involvement of cystatin C in immunity and apoptosis [J]. Immunol Lett, 2018, 196: 80-90. DOI: 10.1016/j.imlet.2018.01.006.
- [11] Kar S, Ukil A, Das PK. Signaling events leading to the curative effect of cystatin on experimental visceral leishmaniasis: involvement of ERK1/2, NF- κ B and JAK/STAT pathways [J]. Eur J Immunol, 2009, 39 (3): 741-751. DOI: 10.1002/eji.200838465.
- [12] Wang Y, Wu L, Liu X, et al. Characterization of a secreted cystatin of the parasitic nematode Haemonchus contortus and its immune-modulatory effect on goat monocytes [J]. Parasit Vectors, 2017, 10 (1): 425. DOI: 10.1186/s13071-017-2368-1.
- [13] Liu K, Tian LX, Tang X, et al. Neutrophilic granule protein (NGP) attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and enhances phagocytosis of bacteria by macrophages [J]. Cytokine, 2020, 128: 155001. DOI: 10.1016/j.cyto.2020.155001.
- [14] 唐欣, 陈涛, 田李星, 等. 细胞色素 P450 1A1 对脂多糖诱导巨噬细胞生成一氧化氮的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32 (5): 605-610. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200204-00167.
Tang X, Chen T, Tian LX, et al. Effects of cytochrome P450 1A1 on nitric oxide production in lipopolysaccharide-induced macrophages [J]. Chin Crit Care Med, 2020, 32 (5): 605-610. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200204-00167.
- [15] Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock [J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1411 (2-3): 437-455. DOI: 10.1016/s0005-2728(99)00031-6.
- [16] Kobayashi Y, Ikeda K, Shinozuka K, et al. L-nitroarginine increases blood pressure in the rat [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1991, 18 (6): 397-399. DOI: 10.1111/j.1440-1681.1991.tb01470.x.
- [17] Pautz A, Art J, Hahn S, et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase [J]. Nitric Oxide, 2010, 23 (2): 75-93. DOI: 10.1016/j.niox.2010.04.007.
- [18] Sareila O, Hämäläinen M, Nissinen E, et al. Orazipone inhibits activation of inflammatory transcription factors nuclear factor- κ B and signal transducer and activator of transcription 1 and decreases inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production in response to inflammatory stimuli [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 324 (2): 858-866. DOI: 10.1124/jpet.107.129114.