

糖原合成酶激酶 3 β 基因高表达对巨噬细胞功能的影响

李媛媛¹, 王硕丰¹, 章越凡¹, 肖振宇¹, 张俊平^{1*}, 万丽丽², 郭澄^{2*}

(1. 第二军医大学药学院生化药学教研室, 上海 200433; 2. 上海交通大学附属第六人民医院药剂科, 上海 200233)

[摘要] **目的:** 了解高表达糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β)对巨噬细胞功能的影响。**方法:** 构建 pcDNA3.1-GSK3 β 真核表达载体, 脂质体转染小鼠巨噬细胞 RAW264.7, G418 筛选获得 GSK3 β 高表达细胞系; 采用中性红染色法、Griess 法和结晶紫染色法分别测定巨噬细胞吞噬功能、细胞上清中一氧化氮(NO)含量和肿瘤坏死因子(TNF)活性。**结果:** 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 高表达 GSK3 β , 经酶切鉴定和测序证明一致, 能抑制巨噬细胞吞噬功能(抑制率 20.4%, $P < 0.05$)和脂多糖(LPS, 1 $\mu\text{g/ml}$)诱导的巨噬细胞 NO 的产生(抑制率 25.6%, $P < 0.01$), 促进 TNF 的产生(增加率 28.8%, $P < 0.01$)。**结论:** GSK3 β 具有调节巨噬细胞参与炎症免疫反应的功能。

[关键词] 糖原合成酶激酶 3 β ; 巨噬细胞; 吞噬作用; 一氧化氮; 肿瘤坏死因子

[中图分类号] R 392 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)07-0697-04

Influence of glycogen synthase kinase 3 β overexpression on function of murine macrophage RAW264.7

LI Yuan-yuan¹, WANG Shuo-feng¹, ZHANG Yue-fan¹, XIAO Zhen-yu¹, ZHANG Jun-ping^{1*}, WAN Li-li², GUO Cheng^{2*}

(1. Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, Sixth People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the influence of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) overexpression on the function of murine macrophage RAW264.7. **Methods:** Eucaryotic vector pcDNA3.1-GSK3 β was constructed and transfected into RAW264.7 cells via lipofectamine 2000. RAW264.7 cells stably expressing GSK3 β were screened by G418 selection. Phagocytosis ability of RAW264.7 cells was assessed by neutral red analysis; the content of nitric oxide (NO) and the activity of tumor necrosis factor (TNF) in the supernatant of RAW264.7 cells stably expressing GSK3 β were determined by Griess method and crystal violet staining assay, respectively. **Results:** RAW264.7 cells stably expressing GSK3 β showed an inhibited phagocytosis ability, with the inhibitory rate being 20.4% ($P < 0.05$), and an inhibited production of NO by RAW264.7 cells stably expressing GSK3 β in presence of 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, with the inhibitory rate being 25.6% ($P < 0.01$). The transfected RAW264.7 cells had an increased production of TNF by 28.8% ($P < 0.01$). **Conclusion:** GSK3 β can regulate macrophages in inflammatory and immune responses.

[KEY WORDS] glycogen synthase kinase 3 β ; macrophages; phagocytosis; nitric oxide; tumor necrosis factor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(7): 697-700]

糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸激酶,除了参与糖原合成外,GSK3 β 还具有调节细胞骨架组构、细胞周期进程以及参与信号转导和基因转录等作用^[1-2]。最近研究发现 GSK3 β 还能调控炎症过程,可能与老年性痴呆、糖尿病和肿瘤等疾病有关^[3]。

商陆皂苷甲(esculentoside A, ESA)是商陆中含量最高的皂苷,对多种急慢性炎症模型有显著的抗炎作用,能抑制激活的巨噬细胞的吞噬功能和抑制多种细胞释放细胞因子和炎性介质,如 IL-1、IL-2、IL-6、TNF、PGE2、PAF 等^[4-8],基因表达谱芯片结果提示 ESA 抗炎免疫调节作用与上调 GSK3 β 等基因有关^[9]。为进一步了解 GSK3 β 在炎症和免疫中的生物学作用,本研究克隆 ESA 作用相关基因 GSK3 β ,构建表达载体,转染小鼠巨噬细胞系

RAW264.7,研究 GSK3 β 对巨噬细胞功能的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 和成纤维细胞 L929 由本校基础部免疫学教研室惠赠。大肠杆菌 DH5 α 菌株,本室保存。

1.2 实验试剂 RPMI 1640 培养基、无酚红 RPMI 1640 培养基、LB 培养基、LPS、PMA、放线菌素 D、G418 均购自 Sigma 公司。小牛血清购自 Gibco 公司。质粒抽提、胶回收试剂盒购自上海华舜生物试

[基金项目] 国家自然科学基金(30472032)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30472032)。

[作者简介] 李媛媛,硕士生。E-mail: layaya19801229@163.com

* Corresponding authors. E-mail: jpzhang08@hotmail.com;

gboss@sina.com

剂公司。限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶及其他工具酶、DNA 相对质量标准均购自 TaKaRa 公司。Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。基因克隆引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。结晶紫、中性红、N-1-萘乙二胺盐酸、对氨基苯磺酸均购自上海华舜生物试剂公司。

1.3 GSK3 β 基因克隆和表达载体构建 从 NCBI 网站下载小鼠 GSK3 β (AF156099)序列,再根据真核表达质粒 pcDNA3.1-myc-his(A)多克隆位点,选择 *Kpn* I 和 *Not* I 为 GSK3 β 基因的克隆位点,设计克隆基因的引物(5'-GGA AGC GGC CGC ACA ATG TCG GGG CGA CCG AG-3';5'-GAA GGT ACC GGT GGA GTT GGA AGC TG-3')。以小鼠正常混合组织 cDNA (CLONTECH 公司)为基因克隆用模板,进行 PCR 扩增 GSK3 β 基因的编码序列,总长约为 1 270 bp。RT-PCR 扩增根据 TaKaRa RNA PCR kit(AMA)Ver 3.0 上的说明进行,条件如下:94 $^{\circ}$ C 5 min,然后再以 94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s 的条件进行 30 个循环,循环结束时加一步 72 $^{\circ}$ C 5 min。采用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Not* I 双酶切回收 PCR 产物及质粒 pcDNA3.1-myc-his(A),凝胶电泳后回收,连接酶连接,转化到 DH5 α ,采用华舜试剂盒抽提质粒,得到表达载体 pcDNA3.1-GSK3 β 。质粒经双酶切,由上海联合基因有限公司测序鉴定。

1.4 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 稳定转染质粒 DNA 取对数生长期 RAW264.7 细胞(2×10^5 /ml) 2 ml 接种于 6 孔培养板,培养 24 h 后细胞融合约 70%~80%,细胞转染质粒 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-GSK3 β 参照 Lipofectamine2000 说明进行。细胞转染 24 h 后,弃去上清,换成含 G418 (500 μ g/ml) 的 DMEM 培养液进行抗性筛选,筛选 14 d 后,正常对照组细胞全部死亡,转染质粒 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-GSK3 β 组均有细胞克隆形成,细胞继续在含 G418 200 μ g/ml 的培养液中扩大培养备用。

1.5 巨噬细胞吞噬功能的测定 参见文献[10]。简述如下:稳定转染 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-GSK3 β 的细胞和正常 RAW264.7 细胞(3×10^5 /ml) 500 μ l 接种于 24 孔板中,加入 LPS 1 μ g/ml 或只加培养液培养 24 h 后,弃去上清,用温热的 PBS 洗 3 次,然后加入 0.04% 的中性红染液 800 μ l/孔在 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,用 PBS 洗 3 次,最后加入细胞溶解液(0.1 mol/L 醋酸:无水乙醇=1:1)400 μ l/孔 4 $^{\circ}$ C 过夜,酶联免疫检测仪 550 nm 处测光密度值(D)。

1.6 一氧化氮的测定 参见文献[11]。简述如下:

稳定转染 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-GSK3 β 的细胞和正常 RAW264.7 细胞(5×10^5 /ml) 1 ml 接种于 24 孔板中培养 24 h 后,加入 LPS 1 μ g/ml (终浓度)孵育 48 h,取上清采用 Griess 法测定 NO 的含量。即取细胞上清 50 μ l 加等量的 Griess 试剂,混合反应 10 min 后,酶标仪 550 nm 处测定 D 值,通过标准曲线计算 NaNO $_2$ 浓度反映 NO 的含量。

1.7 TNF- α 活性测定 参见文献[12]。简述如下:稳定转染 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-GSK3 β 的细胞和正常 RAW264.7 细胞(5×10^5 /ml) 1 ml 接种于 24 孔板中培养 24 h 后,加入 PMA 20 ng/ml (终浓度)孵育 24 h,再加入 LPS 1 μ g/ml 孵育 6 h,取上清采用 L929 细胞为靶细胞,以结晶紫染色法测定 TNF- α 的活性。即 96 孔板中接种 5×10^4 个 L929 细胞培养过夜,然后加入细胞培养上清和放线菌素 D(1 μ g/ml),同时设只加放线菌素 D 对照组。细胞继续培养 20 h 后,弃上清,培养板浸入结晶紫染液中染色 20 min,洗去未被细胞结合的染料,室温干燥后,每孔加入 100 μ l 结晶紫提取液作用 20 min,在酶联免疫检测仪 595 nm 处测 D 值。TNF- α 的活性用杀伤 L929 细胞百分率表示。

1.8 统计学处理 采用 *t* 检验进行组间比较。

2 结果

2.1 GSK3 β 基因克隆与序列鉴定 以小鼠正常混合组织 cDNA 为模板进行 RT-PCR 反应,扩增的 DNA 片段凝胶电泳回收后连接到表达质粒 pcDNA3.1-myc-his(A),转化大肠杆菌 DH5 α ,筛选阳性克隆,提取质粒后进行 *Kpn*I 和 *Not*I 双酶切鉴定(图 1)。表达质粒上所插入的片段约为 1 270 bp。经测序,所测序列在 GenBank 中采用 BLAST 程序进行序列同源性分析的结果表明,该序列与 GenBank 中报道的 GSK3 β 基因序列同源性为 100%。

2.2 RAW264.7 细胞稳定转染 GSK3 β 稳定转染 pcDNA3.1、pcDNA3.1-GSK3 β 的 RAW264.7 细胞和正常细胞,以 GAPDH 作为内参照,验证 RAW264.7 细胞高表达 GSK3 β 的结果。Western 印迹结果显示(图 2),在 RAW264.7 细胞中只有少量的 GSK3 β 蛋白基础表达,LPS 可增加 RAW264.7 细胞 GSK3 β 表达。与稳定转染 pcDNA3.1 对照相比,稳定转染 GSK3 β 的 RAW264.7 细胞 GSK3 β 蛋白表达显著增加。

2.3 RAW264.7 细胞稳定转染 GSK3 β 对巨噬细胞吞噬功能的影响 用中性红染色法进行巨噬细胞吞噬功能测定,结果显示,RAW264.7 细胞稳定转染

pcDNA3.1-GSK3 β 能够抑制 RAW264.7 细胞吞噬功能,与转染 pcDNA3.1 相比,抑制率为 20.4% ($P < 0.05$)。培养液中加入 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$, GSK3 β 对 LPS 诱导的巨噬细胞吞噬功能抑制率为 13.2%,差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 3)。

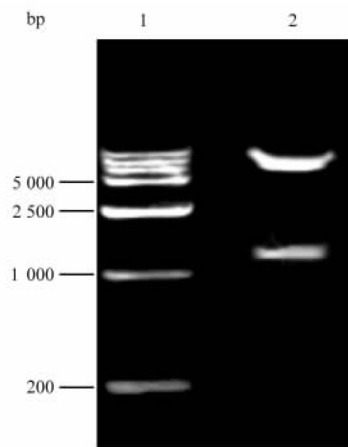


图 1 pcDNA3.1-GSK3 β 酶切鉴定

Fig 1 Verification of constructed pcDNA3.1-GSK3 β by restriction digestion with *Kpn* I and *Not* I

1: Marker; 2: pcDNA3.1-GSK3 β digested by *Kpn* I and *Not* I

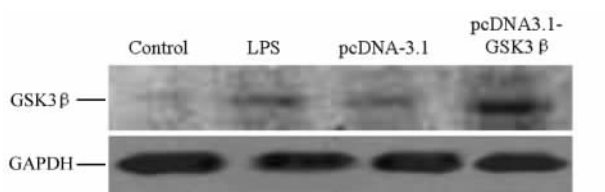


图 2 RAW264.7 细胞高表达 GSK3 β 的鉴定

Fig 2 Western blot analysis of overexpressed GSK3 β in RAW264.7 cells transfected with pcDNA3.1-GSK3 β

2.4 RAW264.7 细胞稳定转染 GSK3 β 对巨噬细胞 NO 产生的影响 稳定转染 pcDNA3.1 后, LPS 刺激 RAW264.7 细胞释放 NO 无显著差异 ($P > 0.05$), 但是, 细胞稳定转染 pcDNA3.1-GSK3 β 能够显著抑制 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) 刺激 RAW264.7 细胞产生 NO, 与转染 pcDNA3.1 相比, 抑制率为 25.6% ($P < 0.01$)。

2.5 RAW264.7 细胞稳定转染 GSK3 β 对巨噬细胞 TNF- α 产生的影响 稳定转染 pcDNA3.1、pcDNA3.1-GSK3 β 的 RAW264.7 细胞和正常的 RAW264.7 细胞加入 LPS 刺激产生 TNF- α , 结晶紫染色法测定细胞上清中的 TNF 活性。稳定转染 pcDNA3.1 后, 先加入 PMA 20 ng/ml 孵育 24 h, 再加入 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 孵育 6 h, RAW264.7 细胞释放 TNF- α 与正常的 RAW264.7 细胞无显著差异 ($P > 0.05$), 但是, 细胞稳定转染 pcDNA3.1-GSK3 β 能够

显著促进 PMA/LPS 刺激 RAW264.7 细胞产生 TNF- α , 与转染 pcDNA3.1 相比, 增加率为 28.8% ($P < 0.01$)。

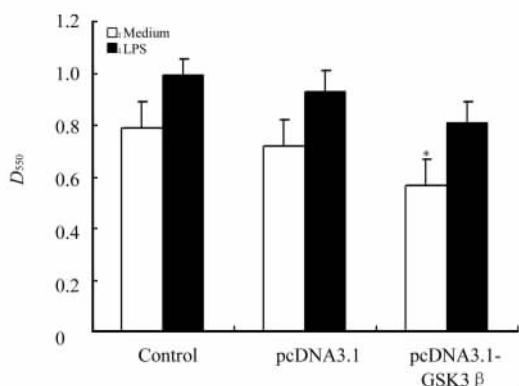


图 3 RAW264.7 细胞高表达 GSK3 β 对细胞吞噬功能的影响

Fig 3 Influence of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) expression on murine macrophage RAW264.7 phagocytosis

RAW264.7 cells over expressing GSK3 β were treated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) or medium alone for 24 h; phagocytosis was measured by neutral red analysis and expressed as absorbance at 550 nm. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs pcDNA3.1 or control group

3 讨论

巨噬细胞是炎症过程中的重要免疫反应细胞, 激活后可通过增加吞噬功能以及释放一些细胞因子和介质参与炎症反应, 但是这些功能改变的细胞内分子机制还不清楚。本研究通过克隆 ESA 作用相关基因 GSK3 β , 进一步研究 GSK3 β 对巨噬细胞功能的影响, 以了解 GSK3 β 在炎症免疫中的生物学作用。

研究结果发现, 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 高表达 GSK3 β 能选择性抑制 LPS 或 PMA 诱导的炎症介质 NO 的产生, 促进致炎的细胞因子 TNF 的产生, 表明 GSK3 β 具有调节巨噬细胞参与炎症反应的功能。LPS 是微生物的重要成分, 巨噬细胞通过 Toll 样受体 (TLR) 识别 LPS 可引起磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 通路激活, 抑制抗炎细胞因子 IL-10 产生, 促进致炎的细胞因子 TNF、IL-12 产生。GSK3 β 是 PI3K 通路的下游分子, GSK3 可选择性调节 LPS 激活 Toll 样受体引起的人单核细胞抗炎细胞因子和致炎的细胞因子的产生。在 GSK 基础表达水平时, LPS 诱导 GSK3 β N 端结构域中丝氨酸 9 残基磷酸化, 促进 TNF 的产生^[13]。本实验在巨噬细胞高表达 GSK3 β 时 LPS 诱导产生 TNF- α 的结果与文献^[13,17]报道一致。TNF 和 NO 产生均与核因子 κB (NF- κB) 的 γ 激活有关^[14], 文献报道, GSK 通过调控

NF- κ B以启动子特异的方式影响特定基因的转录,使TNF、IL-6等基因转录,巨噬细胞炎症蛋白2、I κ B α 等基因不转录^[15]。巨噬细胞高表达GSK3 β 时NO的产生以及吞噬功能改变是否与这种机制有关还有待进一步研究。

GSK3 β 高表达对正常培养条件下巨噬细胞吞噬功能也有显著的抑制作用。在LPS刺激下,巨噬细胞吞噬作用明显增强($P < 0.05$),而高表达GSK3 β 对LPS刺激的巨噬细胞吞噬功能有抑制的趋势(抑制率为13.2%),但统计分析不显著($P > 0.05$)。这种现象说明GSK3 β 对LPS刺激的巨噬细胞吞噬功能的影响机制可能与其影响炎症介质释放不同。

GSK3 β 抑制剂能选择性抑制炎症细胞因子TNF- α 、IL-6、IL-12产生,促进抗炎细胞因子IL-10产生,并且能有效抑制内毒素引起的死亡率以及内毒素血症引起的器官损伤^[13, 16],说明GSK3 β 是一个重要的药靶。ESA具有强大抗炎免疫调节作用,特别是对激活的巨噬细胞具有显著的调节作用,GSK3 β 是否是其作用靶点目前仍在研究中。

[参考文献]

- [1] Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery [J]. *Biochem J*, 2001, 359: 1-16.
- [2] Van Wauwe J, Haefner B. Glycogen synthase kinase-3 as drug target: from wallflower to center of attention [J]. *Drug News Perspect*, 2003, 16: 557-565.
- [3] Jope R S, Yuskaitis C J, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32: 577-595.
- [4] 郑钦岳, 麦凯, 潘祥福, 等. 商陆皂甙甲的抗炎作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 1992, 6: 221.
- [5] Xiao Z Y, Zheng Q Y, Zhang J P, et al. Effect of esculetoside A on autoimmunity in mice and its possible mechanisms [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23: 638-644.
- [6] Xiao Z Y, Zheng Q Y, Jiang Y Y, et al. Effects of esculetoside A on production of interleukin-1, 2, and prostaglandin E2 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25: 817-821.
- [7] Ju D W, Zheng Q Y, Cao X, et al. Esculetoside A inhibits tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 production induced by lipopolysaccharide in mice [J]. *Pharmacology*, 1998, 56: 187-195.
- [8] Xiao Z, Su Y, Yang S, et al. Protective effect of esculetoside A on radiation-induced dermatitis and fibrosis [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 65: 882-889.
- [9] 张俊平, 肖振宇, 桂敏, 等. 基因芯片在免疫药理学中的应用[M]//李晓玉, 李俊. 免疫药理学进展. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 130-162.
- [10] 李书桐, 李铁军, 郑钦岳, 等. 淫羊藿甙对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J]. *第二军医大学学报*, 1995, 16: 541-543.
- [11] 王杰松, 张俊平, 张癸荣, 等. 蛋白酪氨酸激酶抑制剂对炎症因子诱导滑膜细胞产生一氧化氮的影响[J]. *中华风湿病学杂志*, 2005, 9: 89-91.
- [12] 郑钦岳, 王慧峰, 郑向民, 等. 商陆皂甙甲对兔滑膜细胞产生IL-1和TNF的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22: 425-426.
- [13] Martin M, Rehani K, Jope R S, et al. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3 [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6: 777-784.
- [14] Vines A, Cahoon S, Goldberg I, et al. Novel anti-inflammatory role for glycogen synthase kinase-3 β in the inhibition of tumor necrosis factor- α - and interleukin-1 β -induced inflammatory gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 16985-16990.
- [15] Baeuerle P A. I Kappa B-NF-Kappa B structures: at the interface of inflammation control [J]. *Cell*, 1998, 95: 729-731.
- [16] Steinbrecher KA, Wilson W 3rd, Cogswell PC, et al. Glycogen synthase kinase 3 β functions to specify gene-specific, NF- κ B-dependent transcription [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 8444-8455.
- [17] Dugo L, Collin M, Allen D A, et al. GSK-3 β inhibitors attenuate the organ injury dysfunction caused by endotoxemia in the rat [J]. *Crit Care Med*, 2005, 33: 1903-1912.

[收稿日期] 2007-02-05

[修回日期] 2007-03-22

[本文编辑] 尹茶

《咳喘病四季疗法》和《肾病四季疗法》已出版

《咳喘病四季疗法》和《肾病四季疗法》已由人民军医出版社于2007年2月出版,均为小16开,平装。

《咳喘病四季疗法》和《肾病四季疗法》均定价:29.00元。两书对咳喘病和肾病的中医四季治疗进行了全面、系统的阐述,概括了四季气候变化中咳喘病和肾病的特点及防治措施,分别针对春、夏、秋、冬制定了常见呼吸道咳喘病和肾病的辨证施治、常用效验方、偏单秘验方、食治疗法、神治疗法、外治疗法等。全书开创了四季防治咳喘病和肾病的独特疗法,使患者在日常生活每一天的点点滴滴中筑起防病、治病的绿色城墙,让衣、食、住、行都成了治病过程。两书适合呼吸病专科医师及基层医疗单位,更适合患者及患者家属阅读参考。

以上两书均由人民军医出版社市场部发行。

通讯地址:北京市100036信箱188分箱,邮编:100036

电话:010-51927252;010-51927300-8168 E-mail:wanglan@pmmp.com.cn