

MeCP2 增加 LPS 诱导小鼠肺泡巨噬细胞的炎症因子分泌

郑松^{1,2}, 王殿超^{1,2}, 张磊³

摘要 目的 探讨甲基化 CpG 结合蛋白(MeCP2) 对小鼠肺泡巨噬细胞 MH-S 分泌炎症因子的作用。方法 采用 MeCP2-siRNA 抑制 MeCP2 表达, 使用 Q-PCR、ELISA 和 Western blot 方法检测 MeCP2、白介素(IL) -1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF) - α 、p-p65 和 p-I κ B α 的表达情况。结果 Q-PCR 和 ELISA 结果显示脂多糖(LPS) 能够诱导 MH-S 分泌炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 并且 MeCP2 表达也随之显著升高($P < 0.01$)。使用 MeCP2-siRNA 抑制 MeCP2 表达后, 炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达明显降低, 同时 p-p65 和 p-I κ B α 表达也显著下调($P < 0.01$)。结论 抑制 MeCP2 表达能够抑制 LPS 刺激 MH-S 细胞分泌炎症因子, 可能是通过抑制 NF- κ B 的活化, 但具体机制尚需进一步研究。

关键词 MeCP2; MH-S; 炎症因子; NF- κ B
中图分类号 R 34; R 562.1; R 563
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)05-0734-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.05.015

甲基化 CpG 结合蛋白(methyl-CpG-binding protein 2, MeCP2) 是一种甲基化调控蛋白, 能够特异性与甲基化 DNA 结合, 形成复合物来抑制目的蛋白转录。众多文献^[1-2]报道, MeCP2 能够通过调控甲基化水平参与细胞的增殖、迁移、凋亡等多种生理病理过程。研究^[3]表明 MeCP2 可以通过 PTCH1/GLI1 通路调控人急性单核细胞白血病单核细胞株分泌白介素(interleukin, IL) -6 和肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor, TNF) - α 的表达, 但是 MeCP2 在炎症性肺病中的作用未见报道。该研究通过 siRNA 沉默等技术抑制 MeCP2 的表达, 探讨其对小鼠肺泡巨噬细胞小鼠肺泡巨噬细胞(MH-S) 分泌炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的作用, 为炎症性肺病提供基础研究。

2018 - 01 - 31 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(编号: 81100302)

作者单位: ¹ 安徽省胸科医院, 合肥 230022

² 安徽医科大学胸科临床学院, 合肥 230022

³ 安徽医科大学药学院, 安徽省天然药物活性研究重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 郑松, 男, 本科, 主治医师;

张磊, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: amuleizhang@163.com

conditioned medium (EPC-CM) on the proliferation and osteoblastic differentiation ability of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) . **Methods** *In vitro* , isolation , culture and identified adipose mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells(EPCs) . EPC-CM was divided into three different concentrations: the control group (cultured with LG-DMEM) , 50% EPC-CM group (cultured with 50% EPC-CM and 50% LG-DMEM) and 100% EPC-CM group (cultured with 100% EPC-CM) . The proliferation activity of the ADSCs were tested by the CCK-8 method. Alizarin red staining and ALP staining was used to qualitative analysis ADSC osteogenetic differentiation ability. Quantitative test of ALP and calcium ion was used to anlysze ADSCs osteogenetic differentiation ability between three groups. **Results** Immunofluorescence test showed that ADSCs had high expression of CD90 , and could differentiation into osteoblasts and adipocytes and chondroctes. The second generation of EPCs had high expression of CD133 and VEGFR2. In a 96-well culture plate coated with matrix can form a tube-like structure , and it can specificity intake Dil-acLDL and FITC-UEA-1. The proliferation activity of 50% EPC-CM group and 100% EPC-CM group were significantly increased compared with control group , and associated with the concentration of EPC-CM($P < 0.05$) . Quantitative test of ALP after cultured 14 d and 21 d , the ALP activity of ADSCs in 50% EPC-CM group and 100% EPC-CM group were higher than that in the control group ($P < 0.05$) . In the 14th day and 21th day , calcium ions content in 50% EPC-CM group and 100% EPC-CM group were higher than that in the control group ($P < 0.05$) . **Conclusion** EPC-CM can promote the proliferation and osteogenesis differentiation ability of ADSCs , which partly illustrates the mechanism of vascularization cells influence on bone formation.

Key words adipose-derived mesenchymal stem cells; endothelial progenitor cells; osteoblastic differentiation

1 材料与方法

1.1 实验材料 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)购自美国 Sigma 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;DMEM 高糖培养基购自美国 Hyclone 公司;Opti-MEM 购自美国 Gibco 公司;Lipofectamine 2000 Reagent 和 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;Reverse Transcription System 逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;TransStart Tip Green qPCR Super Mix 购自北京全式金生物技术有限公司;RIPA 裂解液和胰酶细胞消化液购自上海碧云天生物技术研究所;小鼠抗 β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;MeCP2 抗体购自美国 abcam 公司;p-p65、p65、p-I κ B α 和 I κ B α 抗体购自美国 Cell signaling 公司;辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α ELISA 试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 实验器材 MK3 型酶标仪购自荷兰雷勃公司;Bio-rad 电泳仪购自美国伯乐公司;PCR 扩增仪购自德国 Eppendorf 公司;实时荧光定量 PCR 仪购自美国赛默飞公司;SW-CJ-4F 型超净工作台购自苏州安泰空气技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 MH-S 细胞培养 小鼠肺泡巨噬细胞 MH-S 细胞购自上海中国科学院细胞库。使用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,在 37 °C、5% CO₂ 和湿度饱和条件下培养,细胞生长到 80% ~ 90% 时进行传代。

1.3.2 MeCP2-siRNA 转染到 MH-S 取对数期 MH-S 细胞,用含 10% 胎牛血清培养基调整细胞浓度为(1.0 ~ 2.0) × 10⁵ /ml 接种于培养瓶;培养 24 h 后,弃去培养基后用 PBS 洗 3 次;16 μ l 的 siRNA 与 8 μ l LipofectamineTM 2000 分别用 500 μ l Opti-MEM 稀释,且孵育 5 min 后混合,室温静置 20 min 后加入培养瓶中,补 Opti-MEM 到 4 ml 后常规培养,8 h 后换成 10% 胎牛血清继续培养 48 h 用于后期实验。MeCP2-siRNA 序列: 5'-GCUUCCCGAUU AACUGAAA TT-3'; 5'-UUUCAGUUA AUCGGGAAGCTT-3'。

1.3.3 Q-PCR 法检测 MeCP2、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 的表达 采用 TRIzol 法提取 MH-S 细胞总 RNA,逆转得到 cDNA。根据 TransStart Tip Green qPCR Super Mix 说明书混合 MeCP2、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 引物和 SYBR Green,使用 Q-PCR 仪检测

MeCP2、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 的表达。见表 1。

表 1 基因引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')	长度(bp)
MeCP2	F: CCAGGCTTTCTACCCCGTTT R: CTGCCAGGTCATGGTGATC	94
IL-6	F: CACACAGACAGCCACTCACC R: AGTGCCTCTTTGCTGCTTTC	130
IL-1 β	F: GGACAAGCTGAGGAAGATGC R: TCGTTATCCCATGTGTGCGAA	120
TNF- α	F: AACCTCCTCTCTGCCATCAA R: CTGAGTCGGTCACCCCTTCTC	125
GAPDH	F: GCCAACACACTGCTGTCTGG R: AGGAGGAGCAATGATCTTG	117

1.3.4 Western blot 法检测 MeCP2、p-p65、p65、p-I κ B α 和 I κ B α 的蛋白表达 取处理后的 MH-S 细胞,加入 400 μ l 的 RIPA(含 100 mmol/L PMSF)细胞裂解液,置于冰上裂解 30 min;4 °C、12 000 r/min,离心 30 min;取上清液加入 SDS 蛋白上样缓冲液,99.9 °C 变性 10 min。样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,通过电转移将蛋白与 PVDF 膜结合上,在 5% 脱脂牛奶中封闭 3 h;TBST 清洗 3 次,每次 15 min;一抗 4 度孵育过夜后,TBST 洗 3 次后二抗室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次后 ECL 发光试剂盒显影。一抗浓度为: MeCP2 (1 : 500)、p-p65 (1 : 500)、p65 (1 : 1 000)、p-I κ B α (1 : 500) 和 I κ B (1 : 1 000);二抗浓度均为 1 : 10 000。用 ImageJ 软件分析,以 β -actin 为内参。

1.3.5 ELISA 法检测 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的蛋白表达 收集处理后的 MH-S 细胞上清液,3 000 r/min,离心 20 min;取上清液于 1.5 ml EP 管内保存。按照试剂盒说明书步骤检测 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的蛋白含量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,所有数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 One-Way ANOVA 及两两比较的 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$,所有检验为双侧检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 诱导 MH-S 细胞对 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达的影响 使用不同浓度的 LPS 刺激 MH-S 后,如图 1 所示,Q-PCR 检测显示 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平随着 LPS 浓度的增加而增加(*F*

= 36.89、18.34、21.77, $P < 0.01$, $P < 0.05$); ELISA 结果同样表明 MH-S 细胞分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的蛋白水平随着 LPS 浓度的增加而增加 ($F = 42.83、32.37、30.81$, $P < 0.05$)。后续实验中选取 LPS 浓度为 1 000 ng/ml 作为刺激 MH-S 浓度。

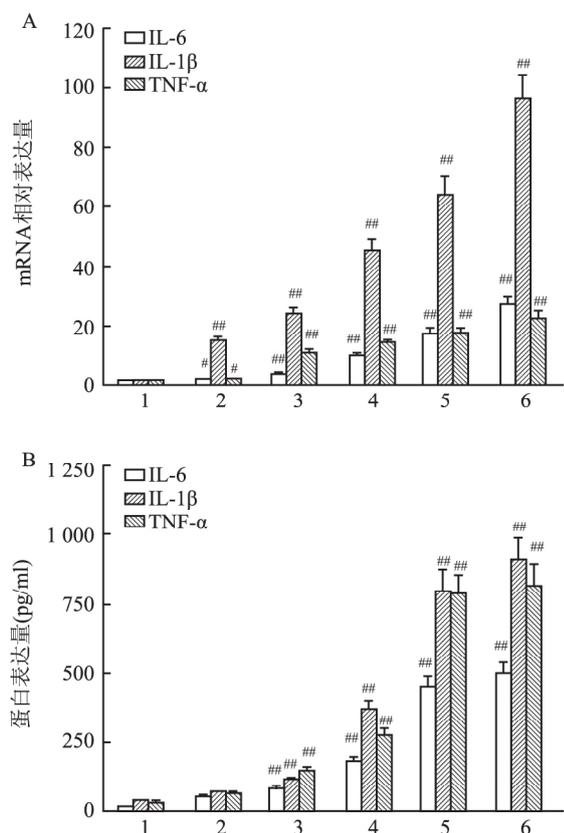


图1 LPS 诱导 MH-S 细胞对 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达的影响
A: LPS 诱导 MH-S 细胞的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达; B: LPS 诱导 MH-S 细胞分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 蛋白表达; 1: 0 ng/ml LPS; 2: 125 ng/ml LPS; 3: 250 ng/ml LPS; 4: 500 ng/ml LPS; 5: 1 000 ng/ml LPS; 6: 2 000 ng/ml LPS; 与 0 ng/ml LPS 比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.2 LPS 诱导 MH-S 细胞对 MeCP2 表达的影响

使用不同浓度的 LPS 刺激 MH-S 细胞后,如图 2 所示,Q-PCR 检测显示 MeCP2 mRNA 的表达水平随着 LPS 浓度的增加而增加 ($F = 19.28$, $P < 0.01$); Western blot 结果显示 MeCP2 蛋白水平同样随着 LPS 浓度的增加而增加,且差异有统计学意义 ($F = 13.21$, $P < 0.01$)。提示 MeCP2 可能与 MH-S 细胞分泌炎症因子有关。

2.3 MeCP2-siRNA 抑制 LPS 诱导 MH-S 对 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 分泌的影响 为了研究 MeCP2 在 MH-S 细胞中的作用,使用 MeCP2-siRNA 沉默 MH-S 中 MeCP2 的表达,分组分别为 Scrambled-

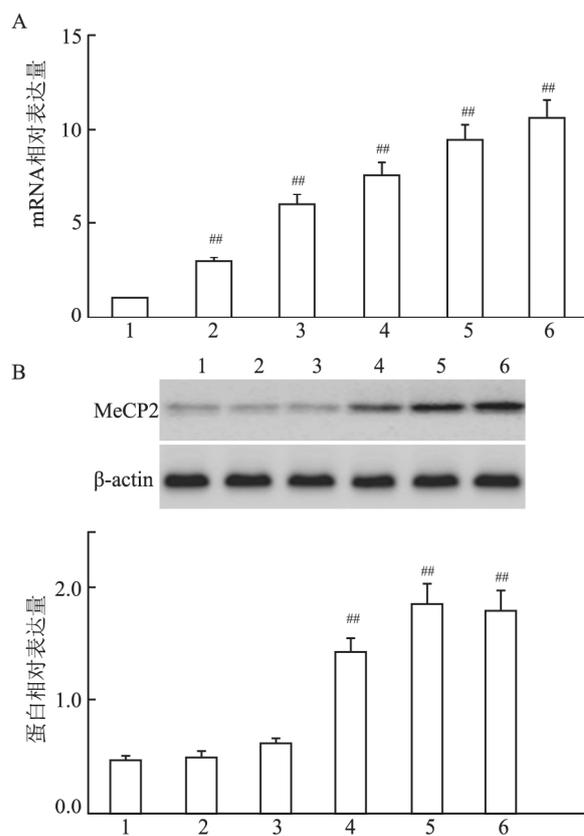


图2 LPS 诱导 MH-S 细胞对 MeCP2 表达的影响

A: LPS 诱导 MH-S 细胞中 MeCP2 基因表达; B: LPS 诱导 MH-S 细胞中 MeCP2 蛋白表达; 1: 0 ng/ml LPS; 2: 125 ng/ml LPS; 3: 250 ng/ml LPS; 4: 500 ng/ml LPS; 5: 1 000 ng/ml LPS; 6: 2 000 ng/ml LPS; 与 0 ng/ml LPS 比较: # $P < 0.01$

RNAi 组,LPS + Scrambled-RNAi 和 LPS + MeCP2-siRNA 组,如图 3 所示,MeCP2-siRNA 显著降低了 MH-S 细胞中的 mRNA 和蛋白的表达水平,且差异有统计学意义 ($F = 22.87、11.29$, $P < 0.05$)。同时使用 Q-PCR 和 ELISA 方法检测显示 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 和分泌蛋白水平明显下降 ($P < 0.05$)。提示抑制 MeCP2 表达能够抑制 LPS 诱导 MH-S 分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达。

2.4 MeCP2-siRNA 抑制 MH-S 对 p-p65 和 p-I κ B α 蛋白表达的影响 为了研究 MeCP2 如何抑制 MH-S 分泌炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达,分组分别为 Scrambled-RNAi 组,LPS + Scrambled-RNAi 和 LPS + MeCP2-siRNA 组,使用 Western blot 检测 NF- κ B 通路显示 p-p65 和 p-I κ B α 的蛋白表达显著降低,且差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。提示 MeCP2 有可能是通过抑制 NF- κ B 通路,进而抑制 LPS 诱导 MH-S 分泌炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达。见图 4。

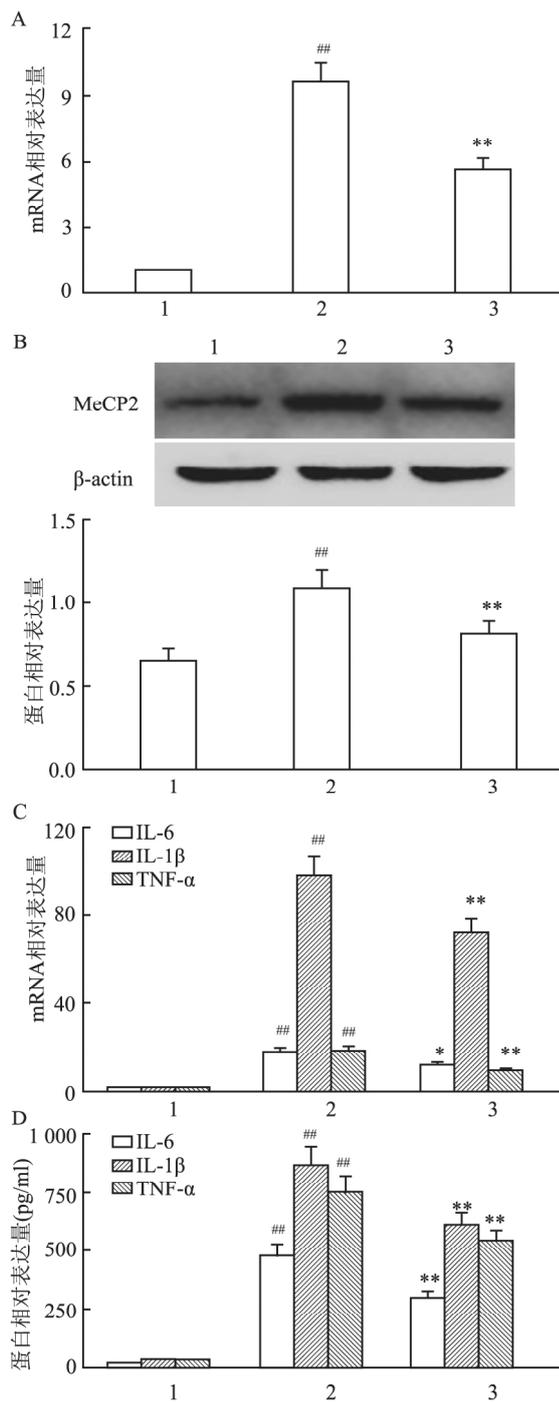


图3 MeCP2-siRNA 抑制 LPS 诱导 MH-S 中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 分泌的影响

A: MeCP2-siRNA 抑制 MH-S 中 MeCP2 mRNA 表达; B: MeCP2-siRNA 抑制 MH-S 中 MeCP2 蛋白表达; C: MeCP2-siRNA 抑制 LPS 诱导 MH-S 中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的 mRNA 表达; D: MeCP2-siRNA 抑制 LPS 诱导 MH-S 分泌 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的蛋白表达; 1: Scrambled-RNAi; 2: LPS + Scrambled-RNAi; 3: LPS + MeCP2-siRNA; 与 Scrambled-RNAi 比较: $^{##}P < 0.01$; 与 LPS + Scrambled-RNAi 比较: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

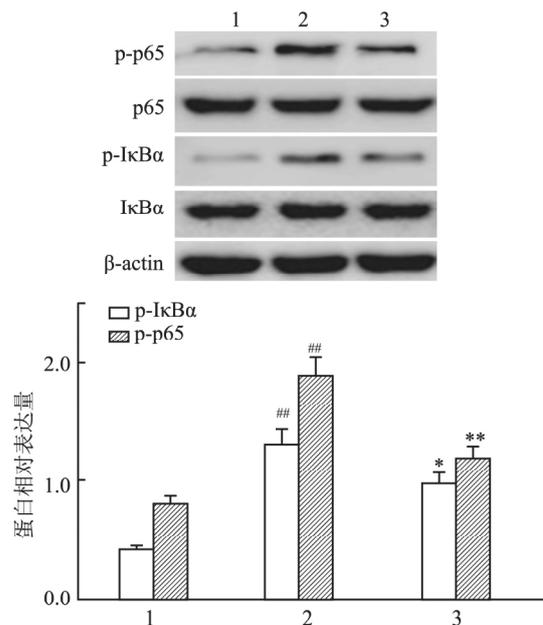


图4 MeCP2-siRNA 抑制 MH-S 对 p-p65 和 p-IκBα 蛋白表达的影响
1: Scrambled-RNAi; 2: LPS + Scrambled-RNAi; 3: LPS + MeCP2-siRNA; 与 Scrambled-RNAi 组比较: $^{##}P < 0.01$; 与 LPS + Scrambled-RNAi 组比较: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

3 讨论

炎症性肺病是由于肺外各种致病因素导致肺及支气管内大量巨噬细胞、中性粒细胞等炎症细胞浸润,释放大量炎症介质进而引起肺内炎症介质和抗炎介质失衡造成的肺脏疾病,如支气管哮喘、急性肺损伤等^[4-5]。因此进一步研究炎症性肺病的发病机制、寻找新的防治靶点仍然是研究的重点。肺泡巨噬细胞是肺内固有的巨噬细胞^[5],能够在异物刺激时分泌大量炎症因子,在清除有害物质中发挥关键作用。研究^[6]表明,肺泡巨噬细胞受到 LPS、干扰素-γ 等刺激后,能够分泌大量炎症因子,如 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 等,能够直接损伤血管内皮细胞,增加血管通透性,引起水肿等。如何抑制肺泡巨噬细胞的炎症因子释放成了治疗和控制炎症性肺部的关键。

本文研究显示,小鼠肺泡巨噬细胞 MH-S 受到 LPS 刺激后,炎症因子和 MeCP2 表达同时升高,说明 MeCP2 可能与 MH-S 细胞分泌炎症因子有关。同时研究^[3]表明 MeCP2 能够抑制肝脏内巨噬细胞分泌 IL-6 和 TNF-α 的表达,提示 MeCP2 与巨噬细胞分泌炎症因子有着密切关系。本文又通过 siRNA 沉默技术特异性沉默 MeCP2 表达后,Q-PCR 和

ELISA 检测显示 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β mRNA 和蛋白表达显著降低,说明可以通过抑制 MeCP2 的表达来降低肺泡巨噬细胞的炎症因子释放。

外源性微生物产生的 LPS 为 Toll 样受体 4 的外源性配体^[7],能够激活 NF- κ B 通路,促进各种炎症因子的表达。在静息的细胞中,NF- κ B 与 I κ B 形成复合物,以无活性形式存在于胞质中^[8]。当细胞受到刺激,I κ B 被磷酸化,暴露 NF- κ B 的核定位点 p65,p65 被磷酸化后迅速进入细胞核,从而引起一系列的炎症因子分泌。NF- κ B 是具有广泛调节作用的核转录因子^[9],因此,NF- κ B 信号通路是炎症性肺病最受关注的信号转导系统之一。本文研究显示抑制 MeCP2 后,p-p65 和 p-I κ B α 表达明显降低,提示 MeCP2 抑制 MH-S 细胞释放炎症因子,可能是通过抑制 NF- κ B 的活化。

综上所述,本研究结果首次证明 MeCP2 在 MH-S 细胞中具有重要作用,抑制 MeCP2 表达能够抑制 LPS 刺激 MH-S 细胞分泌炎症因子,可能是通过抑制 NF- κ B 的活化,但具体机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Matagne V, Ehinger Y, Saidi L, et al. A codon-optimized MeCP2 transgene corrects breathing deficits and improves survival in a mouse model of Rett syndrome [J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 11(99): 1-11.
- [2] Nott A, Cheng J, Gao F, et al. Histone deacetylase 3 associates with MeCP2 to regulate FOXO and social behavior [J]. *Nat Neurosci* 2016, 19(11): 1497-505.
- [3] Ma T T, Li X F, Li W X, et al. Geniposide alleviates inflammation by suppressing MeCP2 in mice with carbon tetrachloride-induced acute liver injury and LPS-treated THP-1 cells [J]. *Int Immunopharmacol* 2015, 29(2): 739-47.
- [4] 王成阳,刘向国,彭青和,等.慢性阻塞性肺疾病大鼠体内调节性 T 细胞、Th17 细胞的变化 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(1): 36-9.
- [5] 韩李念,陈旭林.巨噬细胞在急性肺损伤的作用 [J]. *中华损伤与修复杂志*, 2016, 11(4): 294-7.
- [6] 祁明明,马健,赵凤鸣.升降散对 LPS 诱导大鼠肺泡巨噬细胞 NF- κ B 信号的影响 [J]. *南京中医药大学学报*, 2016, 32(2): 166-9.
- [7] 刘辉,余宏铸,韩珑,等. TLR4 mAb 对人正常肝内胆管上皮细胞 LPS-TLR4-NF- κ B 通路的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(7): 946-9.
- [8] Yang J X, Pan Y Y, Ge J H, et al. Tanshinone II A Attenuates TNF- α -Induced expression of VCAM-1 and ICAM-1 in endothelial progenitor cells by blocking activation of NF- κ B [J]. *Cell Physiol Biochem* 2016, 40(1-2): 195-206.
- [9] 刘亚南,赵霞,陆远,等.固本防哮饮对哮喘缓解期小鼠 IKK/NF- κ B 信号通路的调控作用 [J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(6): 1309-12.

MeCP2 increased LPS-induced secretion of inflammatory cytokines in mouse alveolar macrophages

Zheng Song^{1,2}, Wang Dianchao^{1,2}, Zhang Lei³

(¹Anhui Chest Hospital, Hefei 230022; ²Dept of Chest Clinical Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230022; ³Institute of Pharmacology, Anhui Province Key Laboratory of Natural Drug Activity Research, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the effect of methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) on inflammatory cytokines secreted in alveolar macrophages of mice. **Methods** MeCP2-siRNA was used to inhibit the expression of MeCP2, and the expression of MeCP2, interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , p-p65 and p-I κ B α were detected by Q-PCR, ELISA and Western blot. **Results** Q-PCR and ELISA showed that lipopolysaccharide (LPS) could induce expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α , and the expression of MeCP2 also increased significantly in MH-S cells ($P < 0.01$). The expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α was down-regulated by MeCP2-siRNA ($P < 0.01$), and the expression of p-p65 and p-I κ B α was also down-regulated in MH-S ($P < 0.01$). **Conclusion** Inhibition of MeCP2 expression could inhibit the secretion of inflammatory cytokines by LPS stimulating MH-S cells, possibly through inhibiting NF- κ B activation, however, the specific mechanism needs further study.

Key words MeCP2; MH-S; inflammatory factor; NF- κ B