

原花青素抑制脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞 PGE₂ 生成的机制

陈美瑀¹, 梁统², 周克元²

(1. 厦门大学附属中山医院临检中心, 福建 厦门 361005; 2. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东 湛江 524023)

[摘要] 目的: 观察原花青素对脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞 PGE₂ 生成的影响及其作用机制。方法: 放射免疫法 (RIA) 检测原花青素对脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞 PGE₂ 生成的影响; LPS 诱导 RAW 264.7 细胞 9 h, 再加不同浓度原花青素作用 30 min, 放射免疫 (RIA) 法检测原花青素对 COX-2 酶活性的影响; 半定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 法检测原花青素对 COX-2 mRNA 表达的影响; 提取核蛋白, 蛋白免疫印迹 (western blot) 法检测原花青素对 NF- κ B/p65 蛋白表达的影响; 电泳迁移率变动分析 (EMSA) 法检测原花青素对 NF- κ B 与 DNA 结合活性的影响。结果: 0.8, 4 和 20 mg·L⁻¹ 原花青素抑制 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞 PGE₂ 生成; 0.8, 4 和 20 mg·L⁻¹ 原花青素不影响 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞 COX-2 酶活性; 0.8, 4 和 20 mg·L⁻¹ 原花青素下调 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞 COX-2 mRNA 表达; 4, 20 mg·L⁻¹ 原花青素下调 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞 NF- κ B/p65 蛋白表达; 0.8, 4 和 20 mg·L⁻¹ 的原花青素可明显降低 LPS 诱导下 RAW 264.7 细胞的 NF- κ B 活化。结论: 原花青素显著抑制 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞 PGE₂ 生成的作用与原花青素抑制 COX-2 mRNA 表达有关, 此作用可能是通过抑制 NF- κ B 蛋白表达和抑制 NF- κ B 的 DNA 结合活性来实现。

[关键词] 原花青素; 环氧化酶-2; 前列腺素 E₂; 核转录因子- κ B; 电泳迁移率变动分析**[中图分类号]** R282.71; R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-1237(2009)12-1488-05

The mechanism of proanthocyanidins inhibits PGE₂ synthesis in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells

CHEN Mei-jun¹, LANG Tong², ZHOU Ke-yuan²

(1. Clinical Laboratory Center, Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Biochemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

[Foundation Project]: Natural Science Foundation of Education Department of Guangdong Province (Z03045)**[Author]:** CHEN Mei-jun (1978-), Female, Shicheng Jiangxi, Technician-in-Charge, M. M. Tel: 0592-2993045, E-mail: cmj780721@sohu.com**[Correspondence to]:** LANG Tong (1957-), Male, Zhanjiang Guangdong, Professor, Master Supervisor, TEL: (0759) 23885811, Email: liangt@gdmc.edu.cn

Received: 2009-09-13 Accepted: 2009-11-20

JHMC, 2009; 15(12): 1488-1492

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value

[ABSTRACT] Objective: To study the effect of proanthocyanidins on PGE₂ synthesis in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells and its mechanisms. Methods: The effect of proanthocyanidins on PGE₂ synthesis in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells was measured by radioimmunoassay (RIA); After being pretreated with

[收稿日期] 2009-09-13 [修回日期] 2009-11-20

[基金项目] 广东省教育厅自然科学基金 (Z03045)

[作者简介] 陈美瑀 (1978-), 女, 江西石城人, 主管技师, 硕士 Tel: (0592) 2993045, Email: cmj780721@sohu.com。

[通讯作者] 梁统 (1957-), 男, 广东湛江人, 教授, 硕导, Tel: (0759) 23885811, Email: liangt@gdmc.edu.cn

different concentrations of proanthocyanidins for 30 min, and then LPS $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for 9 h, the effect of proanthocyanidins on the activity of COX-2 enzyme in RAW264.7 cells was analysed by RIA; the expressions of COX-2 mRNA by RT-PCR; the nuclear protein was isolated and the expressions of NF- κ B protein by Western blot; and the DNA-binding activity of NF- κ B was measured by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Results: PGE₂ synthesis was inhibited by proanthocyanidins $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; the activity of COX-2 enzyme was not inhibited by proanthocyanidins $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P > 0.05$, vs LPS group); the expression of COX-2 mRNA was inhibited by proanthocyanidins $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; the expression of NF- κ B/p65 protein was inhibited by proanthocyanidins $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The DNA-binding activity of NF- κ B was reduced by proanthocyanidins $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Conclusion: The mechanisms of proanthocyanidins inhibited PGE₂ synthesis in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells is related to the inhibition of the expression of COX-2 mRNA, which is inhibited possibly by suppressing expression of NF- κ B/p65 protein and DNA-binding activity of NF- κ B.

[KEYWORDS] Proanthocyanidins; Cyclooxygenase-2; Prostaglandin E₂; Nuclear factor of kappa B (NF- κ B); Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

原花青素 (proanthocyanidins, PC) 是一类多酚类化合物的总称,广泛存在于多种植物中,尤其是葡萄籽及葡萄皮中含量较高。原花青素的生物学功效广泛,其具有较强的抗氧化活性,在抗炎^[1]、抗肿瘤^[2]、抗动脉粥样硬化方面均发挥着重要的作用。前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂) 是一种与炎症紧密相关的重要介质,环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 为 PGE₂ 生物合成的重要限速酶,COX 存在两种异构体,分别是 COX-1 和 COX-2,COX-1 为正常表达酶,调节机体的生理平衡与稳定;COX-2 为诱导酶,通常不表达或低表达,在遇到外界刺激如脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 致癌基因等时刻在巨噬细胞、滑膜细胞、内皮细胞等中高表达。从而引起催化产物炎性 PGE₂ 的大量生成,导致红、肿、热、痛等炎症反应。核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是一种具有多向转录调节作用的蛋白质,典型的 NF- κ B 是由 p50 和 p65 两个亚基组成的异二聚体,静息时, NF- κ B 滞留于胞质,胞外刺激如 LPS 刺激可最终使 NF- κ B 解离,核定位序列得以暴露,引导 NF- κ B 转位至核,与靶基因的特异位点结合,调控基因转录。在 COX-2 基因启动子区域存在 NF- κ B 特异结合序列, NF- κ B 的活化与 LPS 诱导 COX-2 基因转录激活紧密相关^[3]。本文采用小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 细胞,观察不同浓度原花青素对 LPS 诱导的 PGE₂ 生成的抑制作用,并以炎性 PGE₂ 合成的关键酶 COX-2 为切入点,观察原花青素对 LPS 诱导的 COX-2 酶活性、COX-2 mRNA 表达、及 COX-2 转录激活重要元件 NF- κ B/p65 蛋白表达和 DNA 结合活性的影响,对其具体抗炎机制进行研究。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

RM I-1640 培养基 (Gibco 公司), 脂多糖 (055:B5) 和花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) (Sigma 公司), PGE₂ 放免试剂盒 (解放军总医院东亚放免研究所), RT-PCR 试剂盒 (Qiagen 公司), ECL 试剂 (Santa Cruz 公司), β -actin 兔 IgG 单克隆抗体、NF- κ B/p65 兔 IgG 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (北京中山公司), 原花青素 (南京学子医化研发中心, 纯度为 95%)。NF- κ B 探针 (上海生物工程公司), [³²P]-ATP (北京亚辉公司), T4 激酶和 DNA 结合缓冲液 (Promega 公司)。其他化学试剂均为分析纯。

1.2 细胞培养

RAW264.7 细胞购自上海细胞研究所, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 条件下, 用含 10% 小牛血清、青霉素 ($1 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)、链霉素 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 RPM I-1640 培养液传代培养, 实验用细胞均处于对数生长期。

1.3 放射免疫法测 PGE₂ 的含量

将对数期生长的 RAW264.7 细胞接种于 24 孔培养板中, 设溶剂 DMSO 对照组、LPS 处理组和 0.8, 4 和 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 原花青素处理组及阳性药物 NS-398 对照组, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 培养 2 h 后, 分别用 0.8, 4 和 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 原花青素预处理 30 min (LPS 诱导组加溶剂 DMSO, 阳性对照组加 NS-398), 加入终浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LPS 继续培养 9 h, 再加入底物 AA (终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 37 $^{\circ}\text{C}$, 20 min, 放免法测定上清液中 PGE₂ 的含量。按以下公式计算抑制

率 (Inhibitory Rate, R)^[4]。

$$\text{公式 R} = \frac{(C_{\text{LPS}} - C_{\text{药物处理组}})}{(C_{\text{LPS}} - C_{\text{DMSO对照组}})} \times 100\%$$

C_{LPS} 、 $C_{\text{药物处理组}}$ 、 $C_{\text{DMSO对照组}}$ 分别为 LPS 诱导组、药物处理组、DMSO 对照组所测 PGE₂ 含量。

1.4 放射免疫法测 CO_x-2 酶活性

参照文献^[4], 略改动。将对数期生长的 RAW 264.7 细胞接种于 24 孔培养板中, 设溶剂 DMSO 对照组、LPS 处理组和 0.8, 4 和 20 mg · L⁻¹ 原花青素处理组及阳性药物 NS-398 对照组, 37 ℃, 5 % CO₂ 培养 2 h 后加入 LPS (终浓度为 1 mg · L⁻¹) 培养 9 h (溶剂 DMSO 对照组不加 LPS), 弃去旧培养液, 用新鲜培养液洗涤 3 次, 分别加入新鲜终浓度为 0.8, 4 和 20 mg · L⁻¹ 原花青素孵育 30 min, 加入底物 AA (终浓度为 10 μmol · L⁻¹), 37 ℃, 20 min, 测定上清液中 PGE₂ 浓度, 反映各受试药物对 CO_x-2 酶活性的直接抑制作用。每组重复 3 次。

1.5 RT-PCR 测 CO_x-2 mRNA 表达

所设组别同 CO_x-2 酶活性测定, 分别在 RAW 264.7 细胞中加入不同浓度的原花青素预孵育 30 min (溶剂 DMSO 对照组和 LPS 处理组加入 0.1 % DMSO), 再分别加入终浓度为 1 mg · L⁻¹ LPS (溶剂 DMSO 对照组除外), 继续在 37 ℃, 5 % CO₂ 培养箱中培养 9 h 后取出。按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 进行 RT-PCR, 内参照物选用 GAPDH。 (CO_x-2, 上游引物为 5'-GGGAAGCCTTCTC-CAACC-3'; 下游引物 5'-GAACCCAGGTCCTCGCTT-3'; GAPDH, 上游引物为 5'-CATCACCACTTCCAG-GAGCG-3'; 下游引物为 5'-GAGGGGCCA TCCA-CAGTCTTC-3')。1.5 % 琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射仪下拍照。

1.6 Western-blot 测 NF- B/p65 蛋白表达

细胞处理同前。细胞核蛋白的提取, 在 4 ℃ 左右操作, 冰冷 PBS (pH 7.2) 洗 1 次, 加缓冲液 A (10 mmol · L⁻¹ HEPES-KOH, 1.5 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol · L⁻¹ KCl, 1 mmol · L⁻¹ EMSF, 10 mg · L⁻¹ Leupeptin, 35 mg · L⁻¹ Aprotinin, 1 mmol · L⁻¹ DTT) 100 μL, 混悬, 冰上肿胀 15 min, 再加 10 % NP-40 10 μL, 涡动 10 s; 10 000 g, 4 ℃, 离心 10 min, 核沉淀; 弃上清, 向核沉淀中加缓冲液 B (20 mmol · L⁻¹ HEPES-KOH, 25 % Glycerol, 420 mmol · L⁻¹ NaCl, 1.5 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 1 mmol · L⁻¹ EMSF, 10 mg · L⁻¹ Leupeptin, 35 mg · L⁻¹ Pepstatin, 10 mg · L⁻¹ Aprotinin, 1 mmol · L⁻¹ DTT) 100 μL, 混悬, 冰浴 30 min, 间以搅拌; 4 ℃, 12 000 g, 10 min, 吸取上清 (核蛋白), 每

组各取 50 μg 样品上样, 于 10 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 分离的蛋白质电转移至硝酸纤维素膜上, 封闭液室温下作用 2 h, 加入兔抗鼠 NF- B/p65 单克隆抗体孵育过夜, TBS (pH 7.6) 洗 5 min × 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 第二抗体反应 2 h, TBS (pH 7.6) 洗 5 min × 3 次, ECL 显色发光, 暗室 x-ray 胶片曝光。实验重复 3 次, 胶片用 Scion Image 软件进行扫描分析处理。

1.7 EMSA 检测 NF- B 的 DNA 结合活性

参照文献^[5]进行, 略改动。(1) 细胞处理和核蛋白提取同前。(2) 用 T4 多核苷酸激酶对含有 NF- B 特异性识别位点的双链脱氧寡核苷酸进行末端标记 [⁻³²P] ATP, NF- B 寡核苷酸双链探针序列: 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCTCCAGGC-3'。(3) DNA 与核蛋白结合反应: 取 10 μg 核蛋白与同位素标记的 DNA 探针在室温下进行结合反应 30 min, 总体积为 10 μL。(4) 电泳及显影: 4 % 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳缓冲液 0.5 × TBE, pH 8.3, 电压 110V, 电流 15 mA, 稳流稳压, 电泳 40 min 后停止电泳。小心剥胶, 干胶 (烤约 20 min), 用保鲜膜包好, -80 ℃ 放射自显影 48 h, 显影后扫描至计算机。(5) 结合带用图像分析软件 BandsScan 4.3 进行光密度积分值分析, 结合活性以相对积分强度 (B. A %) 表示。

2 结果

2.1 原花青素对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞中 CO_x-2 催化生成 PGE₂ 的抑制作用

放射免疫法分析原花青素对 LPS 刺激 RAW 264.7 细胞 PGE₂ 生成的影响见表 1。

表 1 放射免疫法分析原花青素对 LPS 刺激 RAW 264.7 细胞 PGE₂ 生成的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

组别	PGE ₂ (μg · L ⁻¹)	抑制率 (R) (%)
对照组	2.65 ± 0.17	
LPS 组	10.87 ± 0.25 *	
PC 组		
0.8 mg · L ⁻¹	10.73 ± 0.25	2.8 ± 0.4
4 mg · L ⁻¹	5.04 ± 0.09 **	71.3 ± 1.5
20 mg · L ⁻¹	2.97 ± 0.27 **	96.0 ± 4.0
NS-398 组	2.91 ± 0.15 **	97.0 ± 2.3

注: 与对照组相比, * P < 0.01; 与脂多糖诱导组相比, ** P < 0.01。

由表 1 示, 终浓度为 0.8, 4 和 20 mg · L⁻¹ 的原

花青素处理细胞后,对 PGE₂ 生成的抑制率分别 (2.8 ± 0.4) %、(71.3 ± 1.5) %、(96.0 ± 4.0) % ,其中,4 mg · L⁻¹与 20 mg · L⁻¹两个浓度处理组所测得的 PGE₂ 量与 LPS 诱导组相比较,差异有统计学意义 (P < 0.01),20 mg · L⁻¹的原花青素处理组对 PGE₂ 生成的抑制效果与阳性药物选择性 CO_x-2 抑制剂 NS-398 处理组相当,抑制率均达到了 95% 以上。

2.2 原花青素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 CO_x-2 酶活性的影响

放射免疫法分析原花青素对 RAW264.7 细胞中 LPS 诱导的 CO_x-2 活性的影响见表 2。

表 2 放射免疫法分析原花青素对 RAW264.7 细胞中 LPS 诱导的 CO_x-2 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

组别	PGE ₂ (μg · L ⁻¹)
对照组	0.41 ± 0.06
LPS 组	3.70 ± 0.40 *
PC 组	
0.8 mg · L ⁻¹	3.40 ± 0.50
4 mg · L ⁻¹	3.60 ± 0.80
20 mg · L ⁻¹	3.62 ± 0.08
NS-398 组	1.62 ± 0.22 * *

注:与对照组相比, * P < 0.01;与脂多糖诱导组相比, ** P < 0.01。

由表 2 可知,终浓度为 0.8,4 和 20 mg · L⁻¹ 的原花青素对 CO_x-2 的酶活性均无明显影响,与 LPS 诱导组相比较,差异无统计学意义 (P > 0.05);而阳性药物 NS-398 处理组与 LPS 诱导组相比较,PGE₂ 量有明显下降,差异具有统计学意义 (P < 0.01)。本研究表明,原花青素不直接抑制 CO_x-2 酶活性的作用。

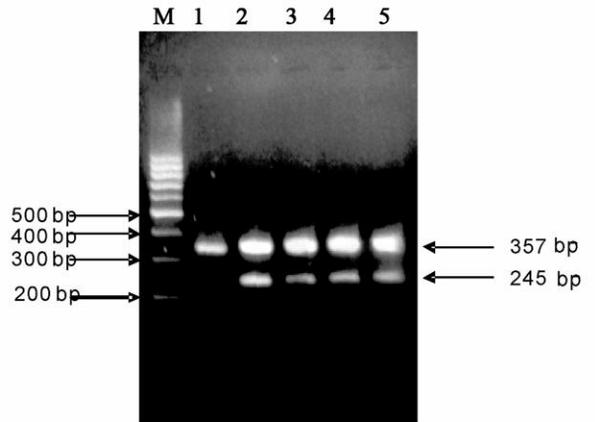
2.3 原花青素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 CO_x-2 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示,LPS 处理组与溶剂 DMSO 对照组相比较,CO_x-2 mRNA 的表达量大幅上调,而分别用终浓度为 0.8,4 和 20 mg · L⁻¹ 的原花青素预处理细胞 30 min 后,随着药物浓度的增加,与 LPS 处理组相比较,CO_x-2 PCR 产物的条带逐渐变细;图像分析结果显示随着药物浓度的增加,与 LPS 处理组相比较,CO_x-2 mRNA 表达减少 (图 1)。

2.4 原花青素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NF- B /p65 蛋白表达的影响

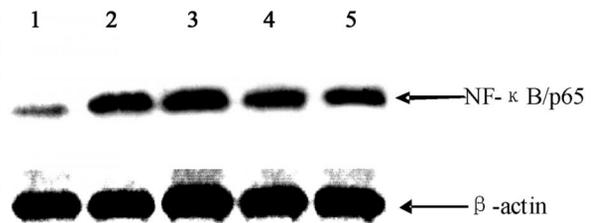
Westem blot 结果显示,终浓度为 1 mg · L⁻¹ LPS

处理细胞后,NF- B /p65 蛋白条带明显变粗,4 mg · L⁻¹和 20 mg · L⁻¹的原花青素处理组分别与 LPS 处理组相比较,蛋白条带逐渐变细,NF- B /p65 蛋白表达量明显降低 (图 2)。



注:M: marker; 1:对照组; 2: 1 mg · L⁻¹ LPS 组; 3: PC (20 mg · L⁻¹) +LPS 组; 4: PC (4 mg · L⁻¹) +LPS 组; 5: PC (0.8 mg · L⁻¹) +LPS 组。

图 1 RT-PCR 分析原花青素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 CO_x-2 基因 mRNA 表达的影响



注:1:对照组; 2: 1 mg · L⁻¹ LPS 组; 3: PC (0.8 mg · L⁻¹) +LPS 组; 4: PC (4 mg · L⁻¹) +LPS 组; 5: PC (20 mg · L⁻¹) +LPS 组。

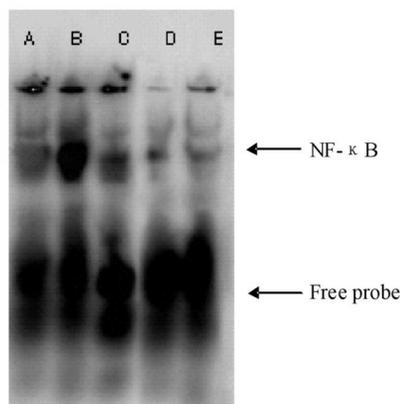
图 2 原花青素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NF- B /p65 蛋白表达的影响

2.5 原花青素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NF- B 的 DNA 结合活性的影响

泳道 A 为未受 LPS 刺激的对照组,在 RAW264.7 细胞核蛋白中仅检测到少量与特异性寡核苷酸探针结合的 NF- B 滞后带。泳道 B 为 LPS 处理组,滞后带明显粗于未受 LPS 刺激的对照组,NF- B 活性明显增强。而用原花青素处理后,随着原花青素浓度的递增,滞后带逐渐变淡,原花青素剂量依赖性地抑制了 LPS 诱导的 NF- B 活性增高 (图 3)。

3 讨论

巨噬细胞是体内重要的炎性和免疫效应细胞,在诱导炎症反应中起着重要的作用,RAW264.7 细胞株是来源于小鼠腹腔中经永生化的巨噬细胞株,



注: 1: 对照组; 2: $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS组; 3: $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + LPS组; 4: $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + LPS组; 5: $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + LPS组。

图 3 EMSA检测原花青素对 LPS 诱导的 RAW 264. 7 细胞中 NF- B DNA 结合活性的影响

可以进行稳定的传代培养, 是小鼠原代巨噬细胞培养的良好模型。LPS 是引起炎症的一类重要诱导剂, 可诱导巨噬细胞中 CO_x-2 高表达, 并由此引起催化产物炎症 PGE_2 的大量生成。由于 LPS 诱导 CO_x-2 高表达的过程中同时涉及到磷脂酶 A2 (Phospholipase A2, PLA2) 的激活, 进一步可产生内源性花生四烯酸 (AA), CO_x-2 催化 AA 生成 PGE_2 等多种代谢产物。由于本研究主要以 CO_x-2 为切入点, 为了消除磷脂酶 A2 活化对 PGE_2 生成的影响, 本实验采用加入足量外源性 AA 作为底物, 这时 PGE_2 的生成主要与 CO_x-2 有关, 此还可作为筛选 CO_x-2 抑制剂的良好模型^[6,7]。本实验观察, $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 原花青素对 PGE_2 合成的抑制率达到 96%, 与阳性对照 NS-398 抑制率接近。说明原花青素对 PGE_2 的生物合成具有较强的抑制作用, 这与 Li 的研究结果一致^[8]。药物抑制由 CO_x-2 催化底物外源 AA 生成 PGE_2 的作用主要与以下两条途径有关: (1) CO_x-2 的活性直接受抑制, 导致 CO_x-2 催化能力的下降; (2) 抑制 CO_x-2 mRNA 生成, 下调 CO_x-2 的酶蛋白水平, 减少 CO_x-2 量的生成, 导致产物 PGE_2 生成的下降。本研究发现, 原花青素并不是以快调节的方式抑制 CO_x-2 介导的 PGE_2 产生, 即原花青素并不直接影响 CO_x-2 的活性, 而是通过抑制 CO_x-2 mRNA 表达, 继而抑制 CO_x-2 介导的 PGE_2 生成。

CO_x-2 启动子上含有 NF- B 位点序列: $5' \text{-GG-GACTTICC-3'}$; 目前的研究表明, NF- B 位点是 CO_x-2 基因启动转录的一个重要元件。NF- B 是启动 CO_x-2 转录激活的重要转录因子^[3]。在 LPS 诱导

下, NF- B 二聚体转位至细胞核内, 接着 NF- B 的 DNA 结合活性增强, 进而与 CO_x-2 基因上 NF- B 位点序列结合, 启动 CO_x-2 的转录过程, 导致 CO_x-2 mRNA 的生成^[9]。对 NF- B 的研究从以下两个方面进行: (1) 提取细胞核蛋白, 用 Western blot 分析易位至核中的 NF- B 二聚体亚基 NF- B /p65 的表达量; (2) 提取细胞核蛋白, 用 EMSA 检测发生核易位的 NF- B 与 DNA 的结合活性。结果显示, LPS 能显著上调 RAW 264. 7 细胞中 NF- B /p65 蛋白表达水平。在对照组中我们也观察到一定的 NF- B /p65 的表达, 可能与细胞培养液中低浓度血清的轻微刺激作用有关。原花青素处理后, NF- B /p65 的蛋白表达受到抑制。我们 EMSA 实验的结果还表明, LPS 诱导组 NF- B 的 DNA 结合活性较对照组明显增强, 原花青素处理后, 随着原花青素浓度的增加, NF- B 的 DNA 结合活性逐渐减弱, 表明原花青素抑制 CO_x-2 的蛋白表达与其抑制 NF- B 密切相关。而陈炜^[10]等也观察到雷公藤内酯醇通过抑制 PC-12 细胞核转录因子 NF- B 活性来实现抑制 LPS 诱导的 PC-12 细胞 CO_x-2 的表达的作用。总的来说, 原花青素除了通过抑制 NF- B 易位至核, 下调核内 NF- B 的表达, 还可能通过影响其他与 NF- B 的 DNA 结合活性密切相关的因素, 强烈地抑制了 NF- B 的 DNA 结合活性, 进而降低 NF- B 介导的炎症相关基因 CO_x-2 的表达, 导致 CO_x-2 催化产物 PGE_2 生成下降。本研究对原花青素抑制 LPS 诱导 RAW 264. 7 细胞 PGE_2 生成的机制有了一定的认识, 并为原花青素用于抗炎治疗提供了较好的理论依据。

参考文献

- 1 Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, et al Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract importance in human health and disease prevention [J]. Toxicology, 2002, 148: 187-197.
- 2 Mittal A, Elmets CA, Katiyar SK Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: relationship to decreased fat and lipid peroxidation [J]. Carcinogenesis, 2003, 24: 1379-1383.
- 3 D'Acquisto F, Maiuri MC, DE Cristofaro F, et al Nitric oxide prevents inducible cyclooxygenase expression by inhibiting nuclear factor- B and nuclear factor-interleukin-6 activation [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2001, 364: 157-165.

(下转第 1497 页)

膜局部微环境会不会是影响 mIEL 的因素? 我们观察了上皮表达 PCNA 的情况。发现 NPC 组黏膜上皮细胞 PCNA 的表达明显强于 NP 组 ($P=0.000$)。在 NPC 组中, PCNA 在黏膜上皮细胞中和在癌细胞中的表达高度正相关 ($P=0.000$), 说明鼻咽癌的微环境中存在着较强的促上皮细胞增生因素。NPC 组黏膜上皮 PCNA 表达强度与 mIEL 数量呈正相关, 表达强者其 mIEL 数量多于表达弱者, 说明在 NPC 组 mIEL 总体水平低下的前提下, 黏膜上皮增生活跃程度可以影响黏膜局部浸润淋巴细胞数量。其影响是否通过上皮细胞分泌的细胞因子的作用, 值得研究。

综上所述, 鼻咽癌组织表面黏膜上皮中的浸润淋巴细胞明显少于慢性鼻咽炎, 其数量变化与其组织中浸润淋巴细胞, 以及浸润 T 淋巴细胞变化一致, 可以反映鼻咽癌组织中淋巴细胞浸润情况。但在不同临床分期无明显变化, 亦与有无淋巴结转移无关, 故不可预测肿瘤进展。黏膜上皮增生状态是影响鼻咽癌 mIEL 数量的因素之一, 上皮增生活跃时 mIEL 数量也增加。

参考文献

- 1 王鑫, 董震. 鼻黏膜获得性免疫及其临床意义 [J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2004, 18 (2): 125-128
- 2 MARSK F. CESTA, Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue [J]. Toxicologic Pathology, 2006, 34: 599-608
- 3 付尚志. 肿瘤的免疫功能研究现状 [J]. 临床军医杂

志, 2002, 30 (5): 95-97.

- 4 Pittet MJ. Behavior of immune players in the tumor micro-environment [J]. Curr Opin Oncol, 2009, 21 (1): 53-59.
- 5 Melief CJ. Cancer immunotherapy by dendritic cells [J]. Immunity, 2008, 29 (3): 372-283.
- 6 Yip WK, Abdullah MA, Yusoff SM, et al. Increase in tumour-infiltrating lymphocytes with regulatory T cell immunophenotypes and reduced zeta-chain expression in nasopharyngeal carcinoma patients [J]. Clin Exp Immunol, 2009, 155 (3): 412-422.
- 7 Chang CS, Chang JH, Hsu NC, et al. Expression of CD80 and CD86 costimulatory molecules are potential markers for better survival in nasopharyngeal carcinoma [J]. BMC Cancer, 2007, 7: 88.
- 8 Fliss-Jaber L, Houissa-Kastally R, Bouzouita K. Cytokine and immunoglobulin production by PWM-stimulated peripheral and tumor-infiltrating lymphocytes of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC) patients [J]. BMC Cancer, 2004, 4: 68.
- 9 张玉晶, 陈育标, 夏云飞, 等. 初治鼻咽癌患者的细胞免疫功能和检测指标的评价 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2004, 11 (6): 481-484.
- 10 苗北平, 卢永田, 许安廷. COX-2, PCNA 及 p53 在鼻咽癌中的表达及意义 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2007, 21 (3): 193-196.
- 11 de Jong D, Enblad G. Inflammatory cells and immune microenvironment in malignant lymphoma [J]. J Intern Med, 2008, 264 (6): 528-536.

(责任编辑 张贤娣, 伍平)

(上接第 1492 页)

- 4 Shen F, Bai AP, Guo ZR, et al. Inhibitory effect of 3, 4-diaryl-3-pyrrolin-2-one derivatives on cyclooxygenase 1 and 2 in murine peritoneal macrophages [J]. Acta Pharm Sin, 2002, 23 (8): 762-768.
- 5 Wang Y, Huang WH. A modified electrophoretic mobility shift assay [J]. Acta academiae medicinae militaris tertiae, 2001, 23 (1): 119-120.
- 6 Wang ZJ, XIE C, Zhang J, et al. Study on screening the cyclooxygenase-2 inhibitor by in vitro method [J]. China Pharm J, 2003, 38 (4): 266-268.
- 7 Pan XZ, Wang L, Cheng J, et al. A screening model of selective COX-2 inhibitors [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2006, 15 (23): 2024-2027.

- 8 Li WG, Zhang XY, Wu YJ, et al. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds [J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22 (12): 1117-1120.
- 9 Tanabe T, Tohno N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002, 68-69.
- 10 Chen W, Shen YD, Yao HP, et al. Inhibition of lipopolysaccharide induced expression of cyclooxygenase-2 in PC-12 cells by tripolide [J]. China Pharm J, 2005, 40 (4): 274-277.

(责任编辑 邝敏)