读书报告

朱振祥

2017.8.19

Cellular Physiology and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2014;34:590-602

DOI: 10.1159/000363025
Published online: August 11, 2014

© 2014 S. Karger AG, Basel
www.karger.com/cpb

Accepted: June 10, 2014

1421-9778/14/0342-0590$39.50/0

This is an Open Access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported license (CC BY-NC) (www.karger.com/OA-license), applicable to the online version of the article only. Distribution permitted for non-commercial purposes only.

Original Paper

GLP-2 Suppresses LPS-Induced Inflammation in Macrophages by Inhibiting ERK Phosphorylation and NF-κB Activation

Shanshan Xie[a] Bingrun Liu[a] Shoupeng Fu[b] Wei Wang[b] Yunhou Yin[c] Nan Li[a]
Wei Chen[b] Juxiong Liu[b] Dianfeng Liu[a]

IF=5.104

目录

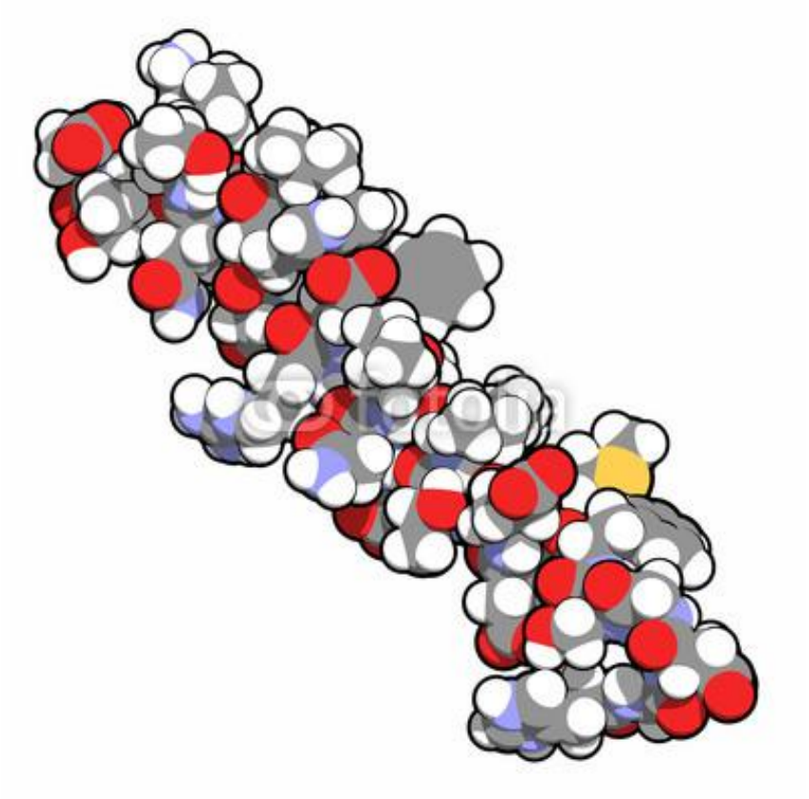
Content

01 背景介绍

02 材料与方法

03 结果

04 讨论分析



背景介绍

Background

背景介绍

胰高血糖素样肽-2（glucagon-like peptide 2，GLP-2）是由肠道 L 内分泌细胞分泌的由33个氨基酸组成的单链多肽，主要通过GLP-2R发挥生物学作用。GLP-2能增加肠道血流量，促进小肠生长、营养物质吸收，抑制胃肠动力和胃酸分泌，降低肠道通透性等作用。

背景介绍

GLP-2 是由胰岛 α 细胞、肠道 L 内分泌细胞和中枢神经系统合成的由 160 个氨基酸组成的高血糖素原的一部分。

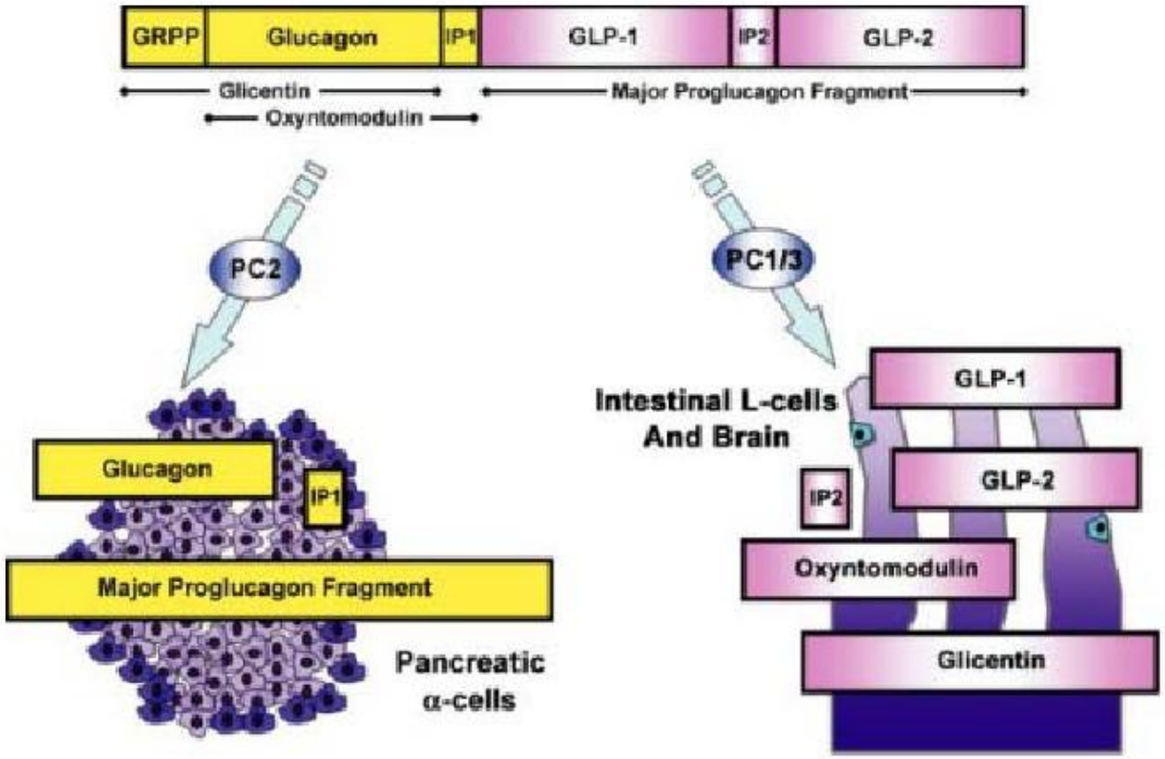
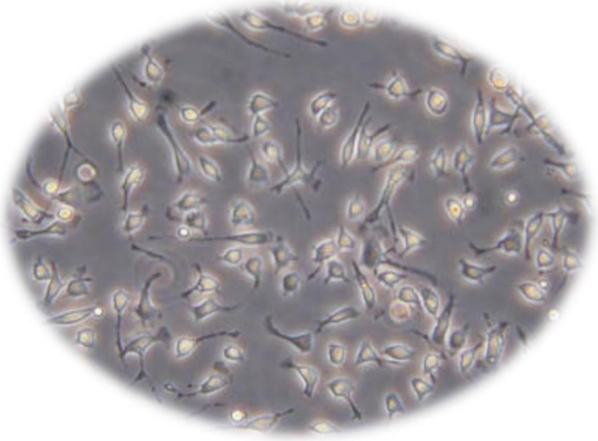


图 1.1.1 高血糖素由 PC2 和 PC1/3 组织特异性处理形式[6]

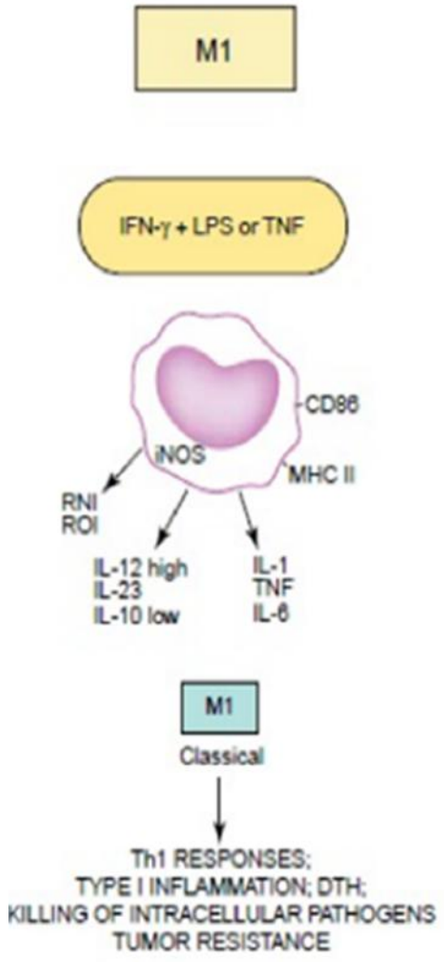
背景介绍

巨噬细胞是先天免疫的重要组成细胞，通过表面模式识别受体识别结合、进而吞噬和清除入侵的病原体或凋亡细胞。当炎症发生时，巨噬细胞分泌不同功能的细胞因子参与炎症反应。然后，过度释放促炎细胞因子会导致多种疾病的发生，如感染性休克、风湿性关节炎和其他慢性炎症性疾病。



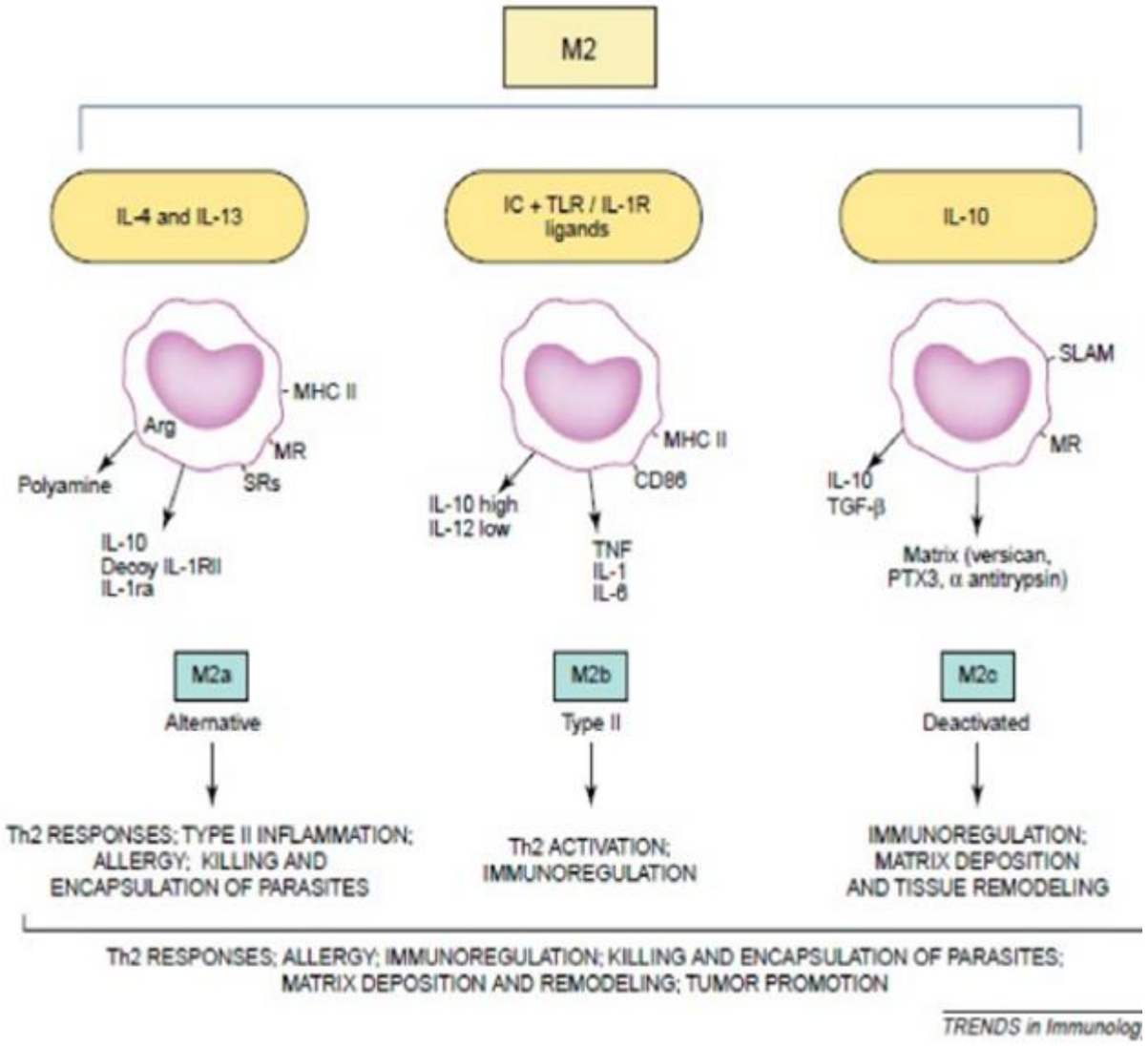
背景介绍

炎症持续发生时，抗原递呈细胞将病原体递呈给巨噬细胞，巨噬细胞根据其所处的不同微环境可以分为两种途径进行活化：经典激活途径主要发生在急性炎症中，先天防御没能成功清除病原体，巨噬细胞吞噬功能的激活依赖于 Th1 型细胞因子，如 Th1 细胞和NK细胞分泌的 IFN-γ、TNF-α 以及细菌等微生物产生的 LPS，被激活的巨噬细胞称为 M1 型巨噬细胞，产生一氧化氮和促炎细胞因子（TNF-α，IL-1，IL-6）。



背景介绍

选择性激活途径中的巨噬细胞也称为 M2 型巨噬细胞。M2 型巨噬细胞按照激活途径和功能不同分为三个子类型，即 M2a、M2b 和 M2c。



背景介绍

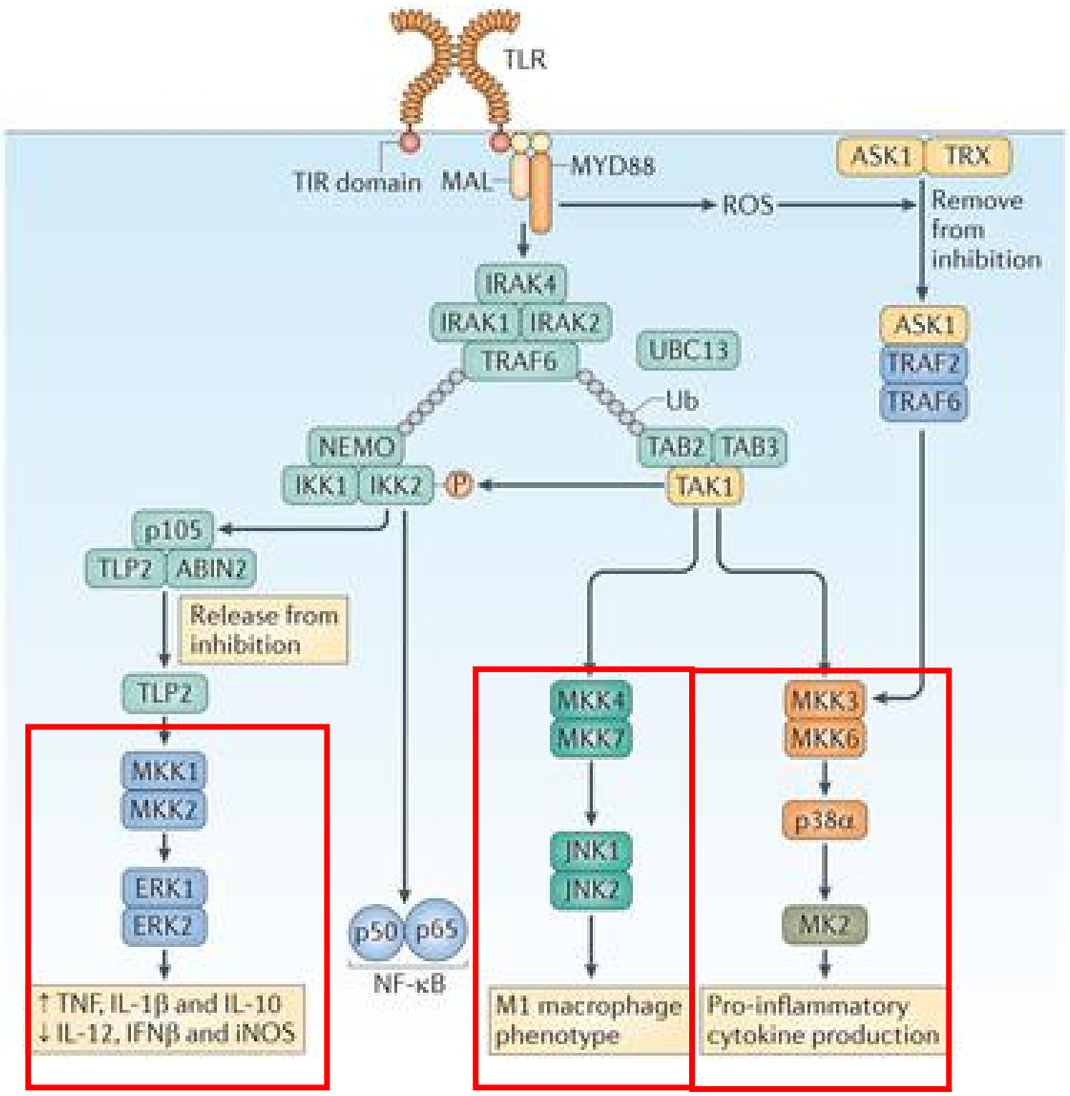
LPS 为革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分，与 LBP、CD14 结合形成 LPS-LBP-CD14 三联复合物作用于巨噬细胞表面的 TLR4，从而活化 MAPKs 和 NF-κB 两条信号通路，诱导相关靶基因的转录，释放 IL-1β、TNF-α、IL-6 等促炎细胞因子。

背景介绍

丝裂原活化蛋白激酶（MAPKs）属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员，调节细胞的生存、凋亡、分化、炎症反应等多种细胞活动。主要包括细胞外信号调节激酶（ERK）、c-Jun 氨基末端激酶（JNK）和 p38 MAPK 三个亚族。

背景介绍

MAPKs 的信号转导遵循保守的 3 级激酶级联传递模式，细胞外的刺激激活 MAPK 激酶激酶（MKKK），从而激活 MAPK 激酶（MKK），发生磷酸化，双磷酸化苏氨酸和酪氨酸残基激活 MAPK，诱导相关基因的转录。



背景介绍

NF-κB 家族包括 Rel A（p65）、c-Rel、Rel B、NF-κB_1（p50 及其前体 p105）和 NF-κB_2（p52 及其前体 p100）五个成员。细胞处于静止状态时，NF-κB 二聚体与其抑制因子 IκB-α 结合在一起，以无活性的形式存在于细胞浆中。当细胞受到 LPS、TNF-α、IL-1 等刺激后，IκB 激酶（IKK)被激活，在 IκB 激酶催化下，IκB 发生磷酸化，泛素化，最后被蛋白酶降解，并与 NF-κB 分离。活化的 NF-κB 转位进入细胞核内，与相关 DNA 序列结合，从而诱导靶基因的转录。活化的 NF-κB快速诱导 Nfk Bia 基因的转录，从而编码 IκB-α 的基因的转录。新合成的 IκB-α进入细胞核，使 NF-κB 与 DNA 解离并排除细胞核，等待重新激活，形成一种负反馈调节。

材料与方法

Material and method

材料与方法

本实验选用 6-8 周龄，体重在 17-21g 左右的清洁级雌性 BALB/c 小鼠（购自吉林大学基础医学院动物实验中心）。动物的饲养环境（包括温度、湿度、噪声、饮食、饮水）均符合国标要求。

材料与方法

巨噬细胞的培养

细胞活性分析

Q-PCR 分析

ELISA、Western blot 分析

小鼠腹腔巨噬细胞的分离培养

于实验前 4d，每只小鼠腹腔注射 4mL 巯基乙酸盐肉汤，照常饲养。用 冷 1640 完全培养基收集细胞悬液至离心管中。调节细胞浓度至合适浓度，接种，置于 37℃，5%CO_2培养箱中培养4~6h或者过夜，吸去未贴壁的细胞，贴壁细胞即为腹腔巨噬细胞。

MTT 法检测 GLP-2 对小鼠腹腔巨噬细胞细胞活力的影响

将巨噬细胞以 2×10^4每孔接种到 96 孔板中，GLP-2 取 4 个浓度梯度(10^{-9}、10^{-8}、10^{-7}、10^{-6}M)，培养 24h，每孔加入 20μL MTT 溶液（5mg/mL），37℃，5%CO_2培养 4h，终止培养，小心吸去孔内培养液，每孔加入 100μL DMSO 溶解紫色结晶物，在酶标仪 570nm 波长处测量各孔的吸光值。

材料与方法

Q-PCR测定：

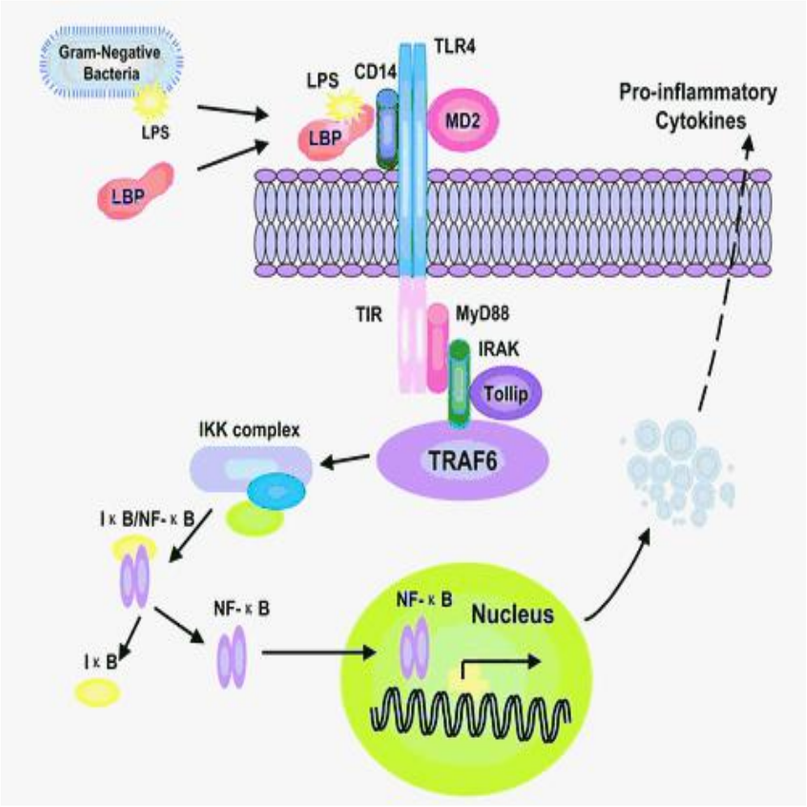
Table 1. The primer sequences of β-actin, GLP-2R, iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β and IL-6

Gene	Sequences	Length (bp)
β-actin	(F)5'- GTCAGGTCATCACTATCGGCAAT -3' (R)5'- AGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT -3'	147
GLP-2R	(F)5'- GGTCCTCCTGCACTACTTT -3' (R)5'- CCAGGGAATAACAAACAGC -3'	163
iNOS	(F)5'- GAACTGTAGCACAGCACAGGAAAT -3' (R)5'- CGTACCGGATGAGCTGTGAAT -3'	158
COX-2	(F)5'- CAGTTTATGTTGTCTGTCCAGAGTTTC -3' (R)5'- CCAGCACTTCACCCATCAGTT -3'	127
TNF-α	(F)5'- GCAACTGCTGCACGAAATC -3' (R)5'- CTGCTTGTCCTCTGCCCAC -3'	136
IL-1β	(F)5'- GTTCCCATTAGACAACTGCACTACAG -3' (R)5'- GTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGTA -3'	139
IL-6	(F)5'- CCAGAAACCGCTATGAAGTTCC -3' (R)5'- GTTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA -3'	138

中间有一步为，去除基因组 DNA 反应。

蛋白处理：

细胞处理如上，弃培养基，加入 1m L 的冷 PBS，用细胞刮将细胞刮下，将细胞悬液移入 1.5m L 的离心管中。4℃，13000g 离心 3min。弃 PBS，加入 70μL含蛋白酶抑制剂（现用现加）的蛋白裂解液，吹打混匀，4℃裂解 30min。4℃13000g 离心 10min，取蛋白上清至另一预冷的 1.5m L 离心管中，放于-80℃保存，避免反复冻融。

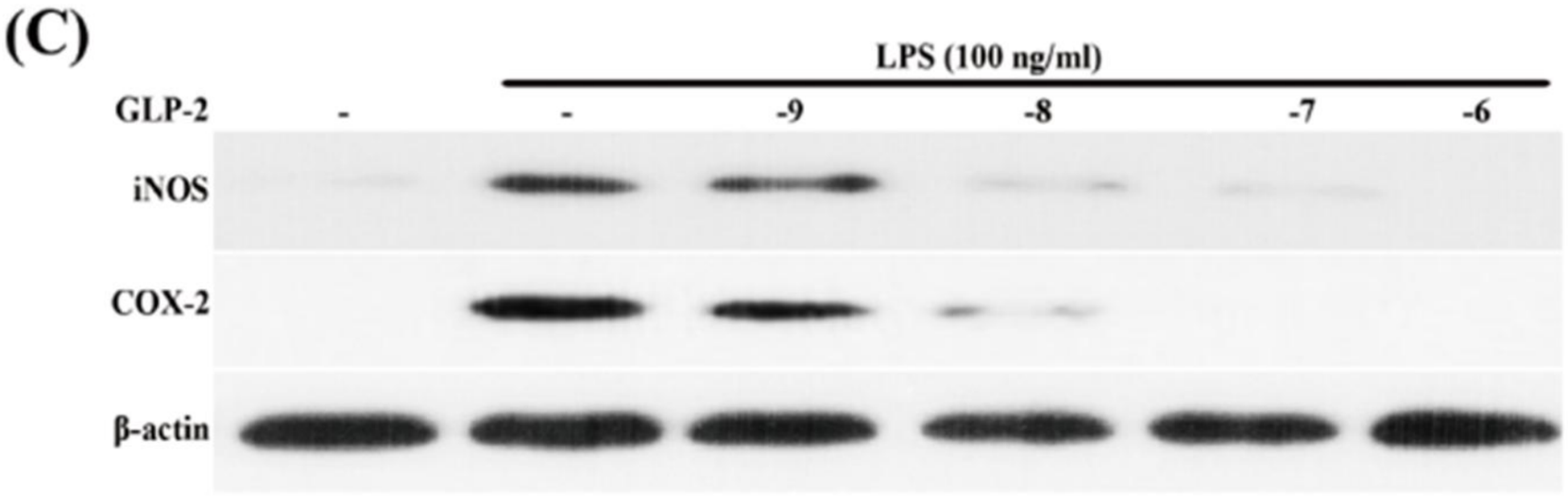

Gram-Negative Bacteria
LPS
LBP
LPS
CD14
LBP
TLR4
MD2
Pro-inflammatory Cytokines
TIR
MyD88
IRAK
Tollip
TRAF6
IKK complex
I κ B/NF- κ B
I κ B
NF- κ B
NF- κ B
Nucleus

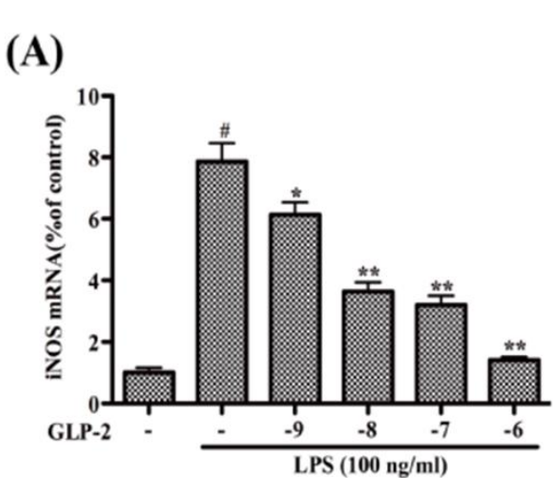
结果

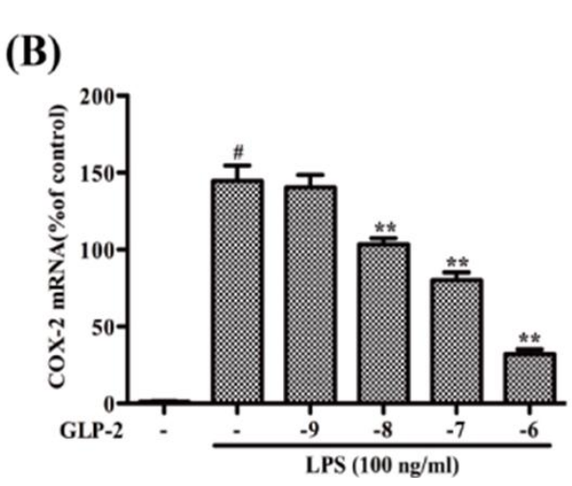
Results

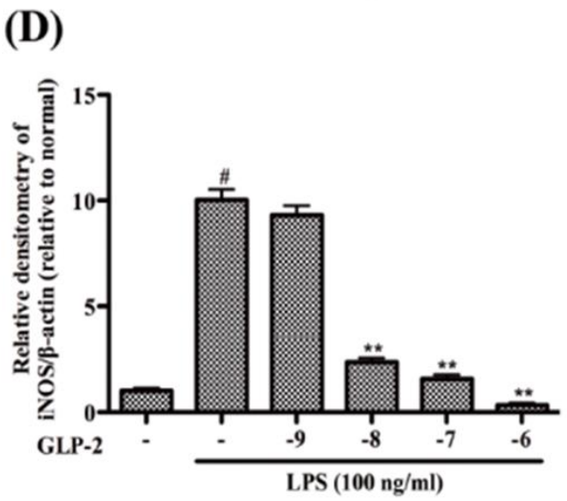
结果

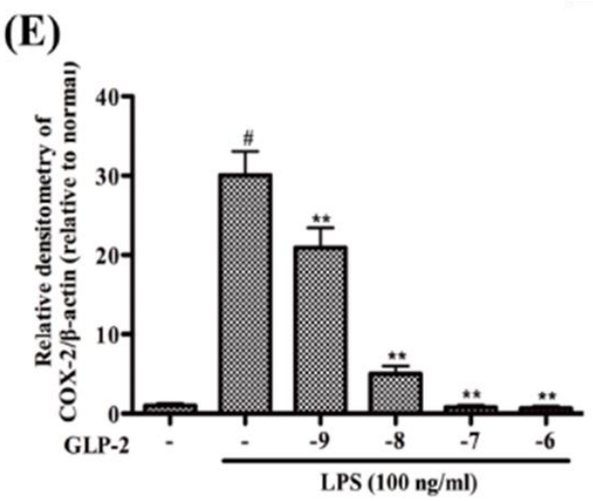
iNOS 和 COX-2 等促炎酶的蛋白质和mRNA的表达





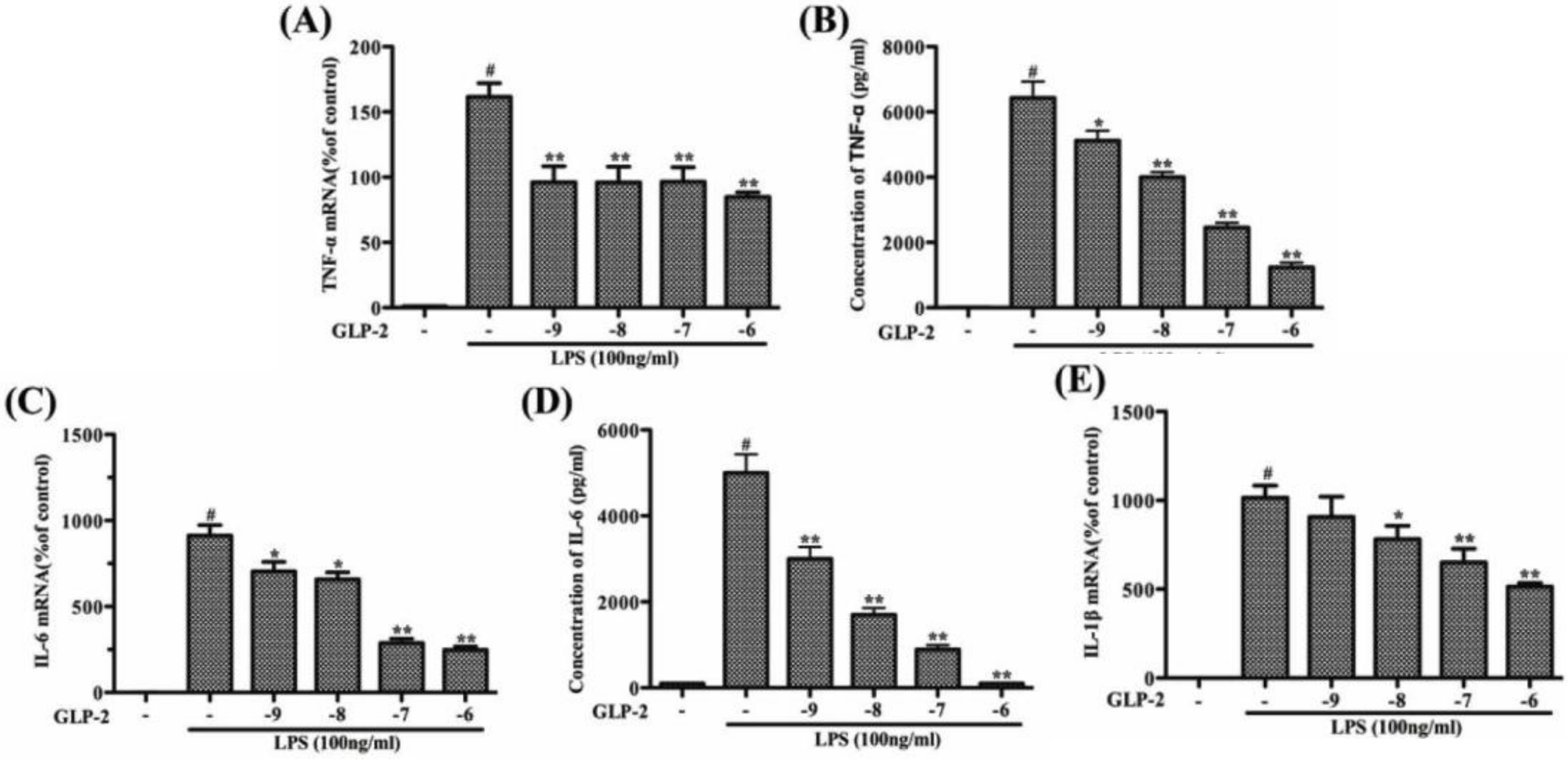






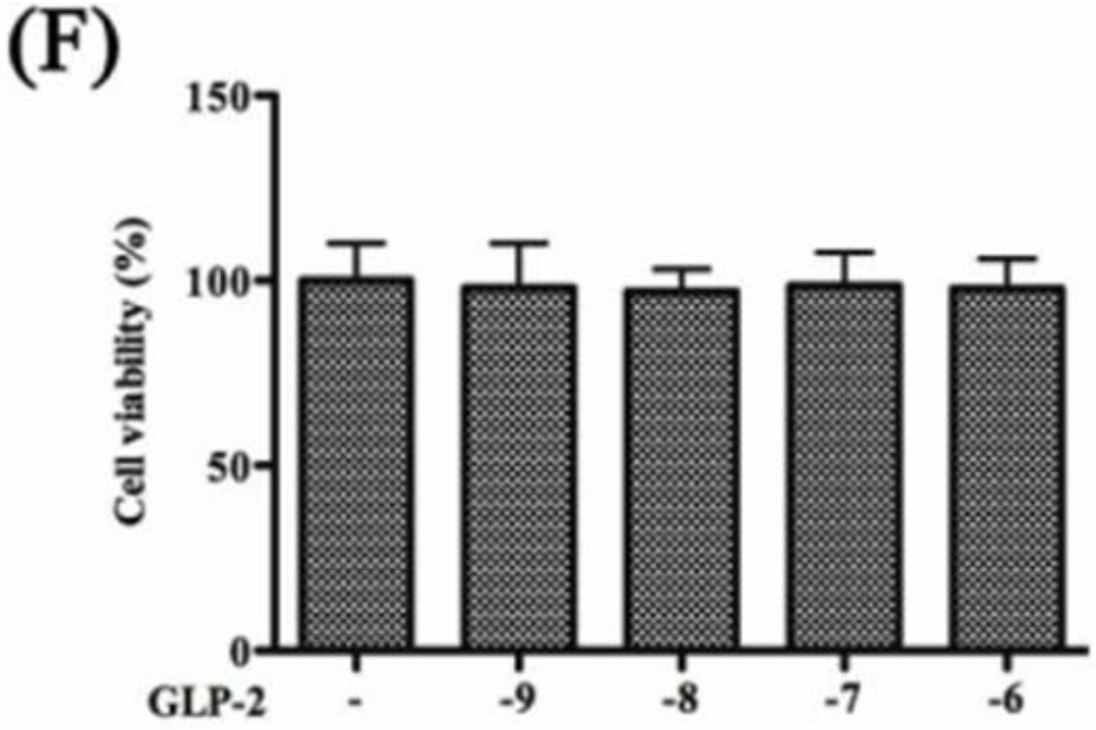
结果

TNF-a, IL-1β 和 IL-6蛋白质和mRNA的表达



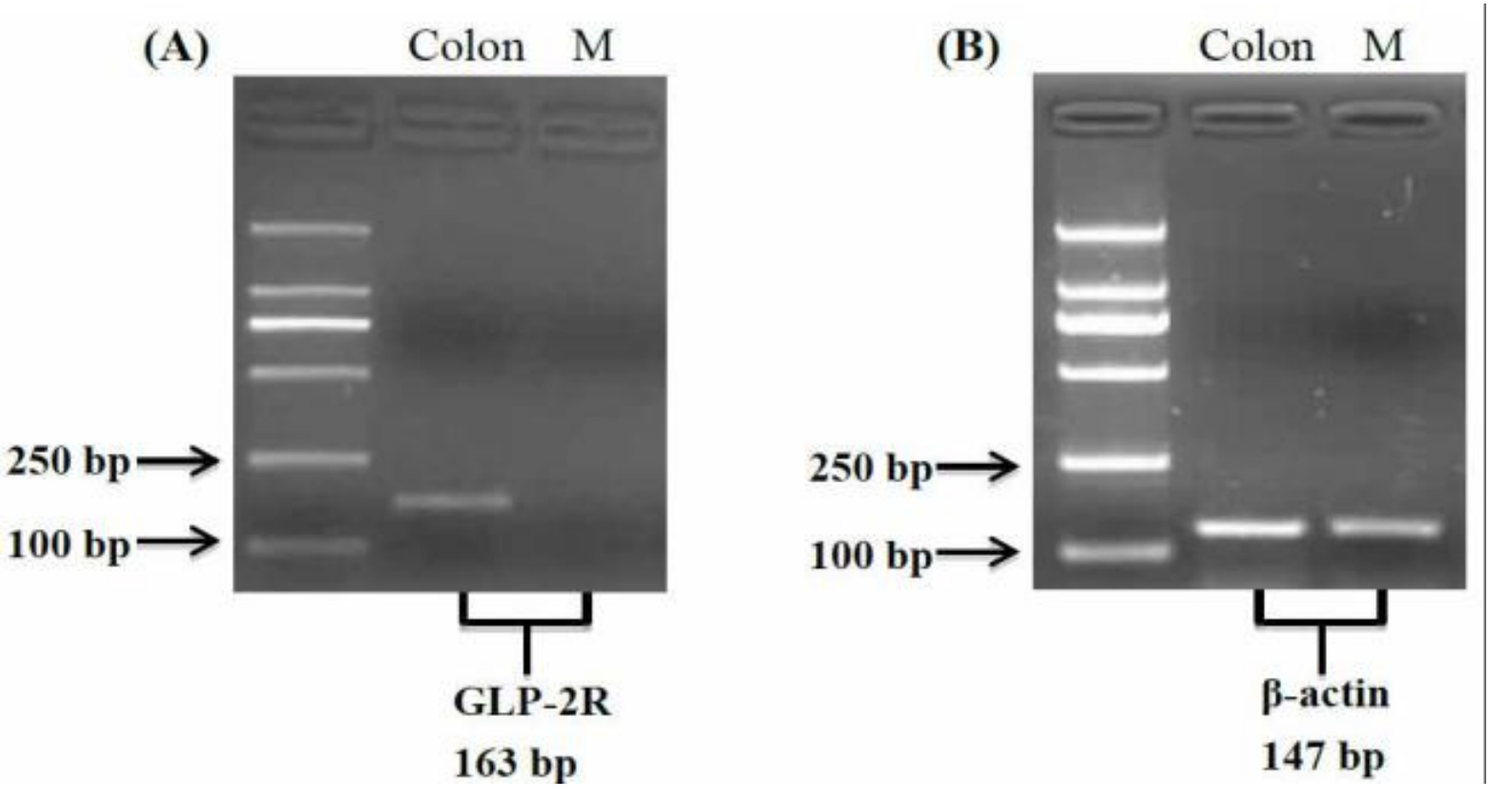
结果

巨噬细胞细胞活力的检测（MTT 法）



结果

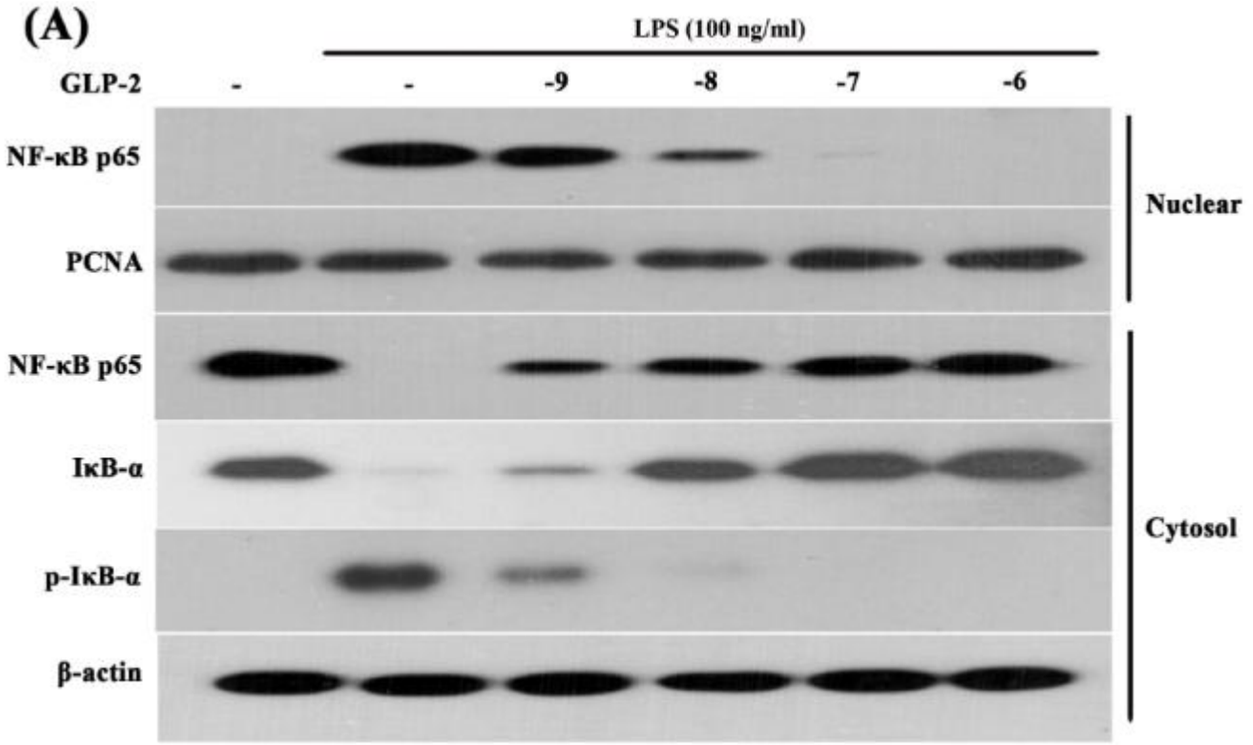
巨噬细胞GLP-2R的检测

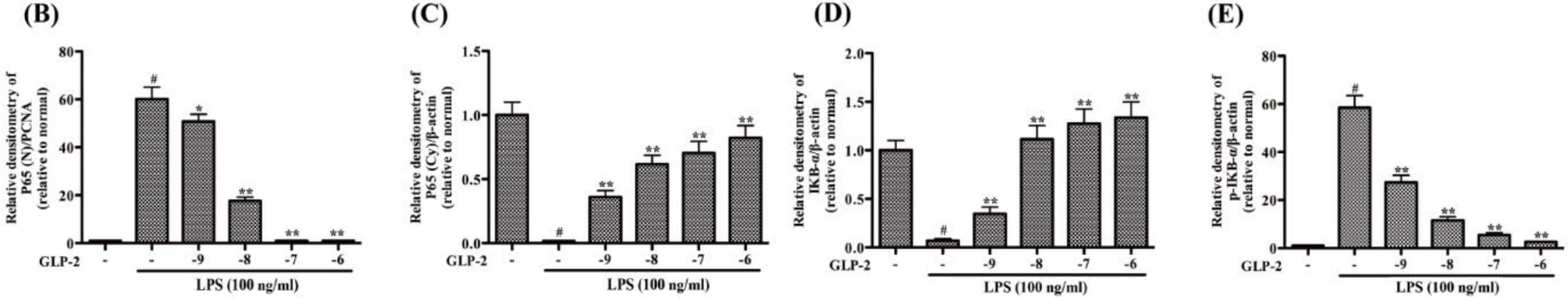


巨噬细胞　　肠道

结果

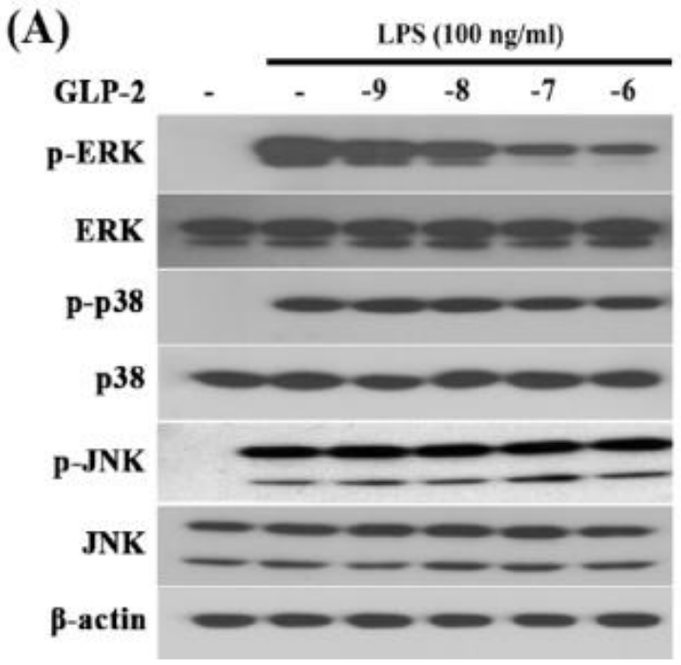
NF-κB、 IκB-α的表达

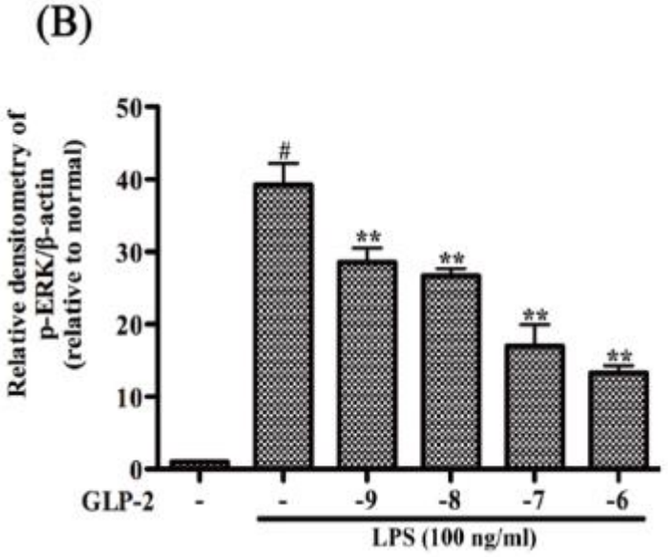


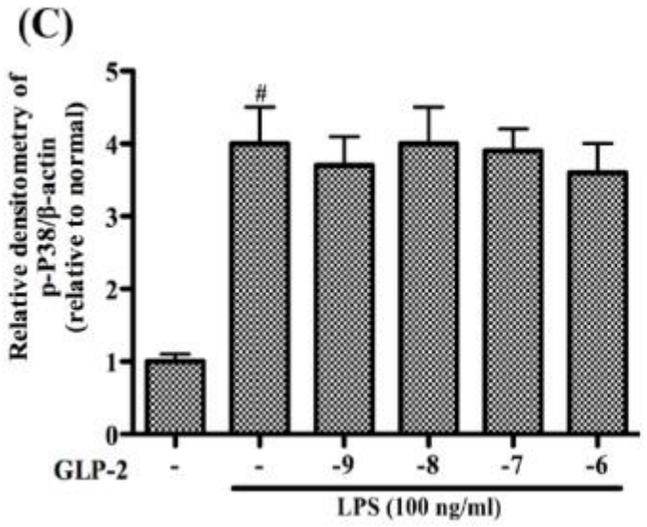


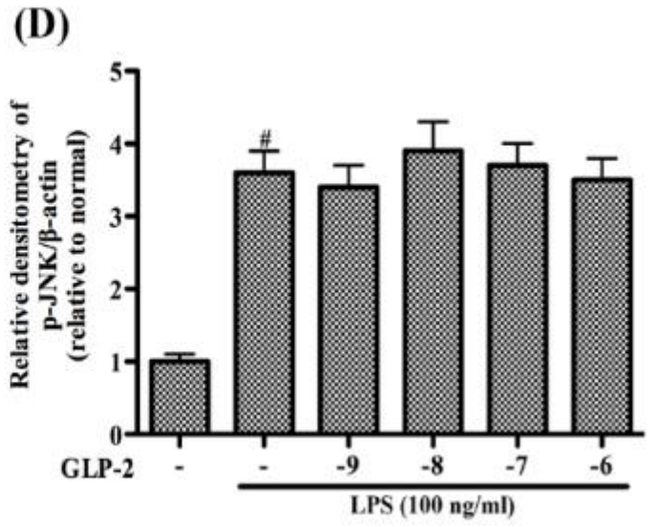
结果

ERK 的表达量


(A)
LPS (100 ng/ml)
GLP-2 - - -9 -8 -7 -6
p-ERK
ERK
p-p38
p38
p-JNK
JNK
β-actin


(B)
Relative densitometry of p-ERK/β-actin (relative to normal)
50
40
30
20
10
0
#
**
**
**
**
GLP-2 - - -9 -8 -7 -6
LPS (100 ng/ml)


(C)
Relative densitometry of p-P38/β-actin (relative to normal)
5
4
3
2
1
0
#
GLP-2 - - -9 -8 -7 -6
LPS (100 ng/ml)


(D)
Relative densitometry of p-JNK/β-actin (relative to normal)
5
4
3
2
1
0
#
GLP-2 - - -9 -8 -7 -6
LPS (100 ng/ml)

结果

1. GLP-2 能显著降低 LPS 活化的腹腔巨噬细胞中促炎酶（iNOS 和 COX-2）和促炎细胞因子（IL-1β、TNF-α 和 IL-6）m RNA 和蛋白的表达水平。

2.GLP-2 能够显著抑制 LPS 活化的腹腔巨噬细胞的促炎反应，具有减轻炎症的作用。

3.分离培养的 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞没有检测到 GLP-2R 的表达。

4. 与 LPS 对照组相比，LPS 活化组的小鼠腹腔巨噬细胞中 GLP-2 能够显著抑制 ERK 的磷酸化。

5.与 LPS 对照组相比，LPS 活化组的小鼠腹腔巨噬细胞中 GLP-2 能够显著抑制IκB-α 的磷酸化和 NF-κB 的核转位。

讨论分析

Discussion

讨论分析

1.有文献报道，在不表达已知的 GLP-2R 的细胞中存在 GLP-2 活化的信号转导机制，提示 GLP-2 可能间接发挥调节作用。

2.结果显示，LPS 能显著增加巨噬细胞中 ERK、JNK 和 p38 的磷酸化水平，GLP-2 能够显著抑制ERK 的磷酸化水平，并呈剂量依赖性，对 JNK 和 p38 的磷酸化水平无明显影响。说明，GLP-2 抑制 LPS 活化巨噬细胞促炎酶和促炎因子的表达，是通过抑制 LPS 活化巨噬细胞中 ERK 的磷酸化完成的。

讨论分析

3.GLP-2 对 LPS 活化巨噬细胞中 IκB-α 蛋白磷酸化和 NF-κB 核转位的影响，说明，GLP-2 抑制 LPS 活化巨噬细胞促炎酶和促炎因子的表达，，是通过抑制 LPS 活化巨噬细胞中 NF-κB 的核转位完成的。

4.通过Q-PCR 和 Western blot 检测了 GLP-2 和/或 LPS 处理后巨噬细胞中 iNOS、COX-2 m RNA 和蛋白的表达情况，表明GLP-2 能够抑制 LPS 活化巨噬细胞中 iNOS、COX-2、IL-1β、TNF-α 和 IL-6基因的转录和蛋白的表达，具有减轻炎症的作用。 IL-1β未检测到蛋白，可能与其蛋白成熟方式有关。

感谢聆听

请各位老师批评指正！