

Ghrelin通过 JNK 信号通路抑制 LPS 诱导的肺泡巨噬细胞凋亡

李 斌, 曾 勉*, 何婉媚, 黄春容
(中山大学附属第一医院 MICU, 广东 广州 510080)

摘 要: 【目的】观察体外条件下加入外源性 ghrelin 对内毒素(LPS)诱导大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 凋亡以及吞噬能力的影响,并探讨 JNK(c-Jun N-terminal kinase)信号通路在其中所起的作用。【方法】用 CCK-8(Cell Counting Kit-8)法检测加入 LPS 或者 ghrelin 与 LPS 共孵育后 NR8383 的细胞毒性;流式细胞技术、原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡率;Western blot 检测 JNK、phospho-JNK 信号通路蛋白以及 cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2 凋亡相关分子蛋白的表达;激光共聚焦技术检测巨噬细胞的吞噬能力;使用 ghrelin 受体拮抗剂[D-Lys-3]-GHRP-6、JNK 特异性抑制剂 SP600125 分别抑制 ghrelin 受体及 JNK 激酶的激活。【结果】CCK-8 检测结果显示 LPS 可显著抑制 NR8383 增殖,而 ghrelin 可呈浓度依赖性地阻断这种抑制作用;流式和 TUNEL 检测进一步证实 ghrelin 可显著降低 LPS 所致 NR8383 凋亡作用($P < 0.05$),而应用 ghrelin 受体拮抗剂[D-Lys-3]-GHRP-6 可以减弱 ghrelin 的抗凋亡效果($P < 0.05$);LPS 可以激活 JNK 激酶活性,并改变其下游凋亡相关蛋白的表达,其中促凋亡蛋白 Bax 以及 cleaved caspase-3 表达上调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,应用 ghrelin 可以逆转 LPS 对 JNK 激酶的激活,继而下调 Bax 以及 cleaved caspase-3 的表达,上调 Bcl-2 的表达,差异均具有统计学意义($P < 0.05$);ghrelin 还可以维持 LPS 持续刺激下 NR8383 的吞噬能力($P < 0.05$)。【结论】ghrelin 通过下调 JNK 信号通路的激活抑制 LPS 诱导的 NR8383 的凋亡,并维持其吞噬能力。

关键词: ghrelin;凋亡;内毒素;肺泡巨噬细胞; c-Jun N-terminal kinase (JNK)

中图分类号: R363

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2015)02-0181-08

Ghrelin Affects LPS-induced NR8383 Cell Apoptosis through c-Jun N-terminal Kinase Signaling Pathway

LI Bin, ZENG Mian*, HE Wan-mei, HUANG Chun-rong

(Department of MICU, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: ZENG Mian, E-mail: zengmian2004@163.com

Abstract: 【Objective】 To observe the effects of in vitro exogenous administration of ghrelin on LPS induced apoptosis in rat alveolar macrophage NR8383, and to investigate the potential role of JNK signaling pathway in this impact. 【Methods】 CCK-8 assay was used to examine the cell viability of NR8383 treated by LPS alone or co-incubated by ghrelin and LPS; flow cytometry and TUNEL were used to assessed the apoptosis rate; expression of JNK, phospho-JNK, Bax, Bcl-2, cleaved caspase-3 were detected using Western blot analysis. Laser scanning confocal microscopy was used to observe the phagocytosis of NR8383. Ghrelin receptor antagonist [D-Lys-3]-GHRP-6 and JNK specific inhibitor SP600125 were used to inhibit ghrelin receptor and JNK activation respectively. 【Results】 LPS significantly inhibited the proliferation of NR8383 in a dose-dependent manner, with IC₅₀ value of 250 $\mu\text{g/mL}$. However, ghrelin can block this inhibition caused by LPS. Flow cytometry and TUNEL analysis showed that ghrelin could decrease the apoptosis induced by LPS in NR8383 ($P < 0.05$), while application of ghrelin receptor antagonist [D-Lys-3]-GHRP-6 weakened the antiapoptosis effect of ghrelin ($P < 0.05$). LPS activated JNK kinase, increased the expression of Bax and cleaved caspase-3, but decreased Bcl-2 level, which was significantly reversed by pretreatment with ghrelin ($P < 0.05$). Ghrelin also apparently maintained the phagocytosis of NR8383 post LPS treatment ($P < 0.05$). 【Conclusion】 Ghrelin inhibited LPS induced

收稿日期: 2014-10-22

基金项目: 广东省自然科学基金(S2013010015025); 广州市科技计划项目(2014Y2-00136)

作者简介: 李斌, 硕士研究生, 研究方向: 呼吸与危重症医学, E-mail: libinchenzhou@163.com; * 通信作者: 曾勉, 教授, 硕士生导师, 主任医师, 研究方向: 呼吸与危重症医学, E-mail: zengmian2004@163.com

NR8383 apoptosis by down-regulating JNK signal pathway, and maintained the phagocytosis of NR8383.

Key words: ghrelin; apoptosis; LPS (lipopolysaccharide); alveolar macrophage; JNK(c-Jun N-terminal kinase)

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2015,36(2):181-188]

ghrelin是一种含有 28 个氨基酸残基的生长激素释放肽(growth hormone releasing peptide),是生长激素促泌素受体(growth hormone secretagogue receptor, GHS-R)的内源性配体,主要在胃组织内合成,并释放入血循环作用于全身^[1]。ghrelin 和它的受体 GHS-R 广泛表达于多种组织,其中就包括肺组织,决定了其功能的多样性,除了已知能增进食欲,促进脂肪合成,改善心血管功能等功能外,许多研究证实 ghrelin 还能抑制多种细胞的凋亡^[2-3]。由于 ghrelin 及其受体在肺组织的表达提示其可能具有调节肺内稳态的潜能,研究者们对 ghrelin 在肺内的功能进行了广泛研究,发现 ghrelin 在肺组织的能量代谢效应、内分泌效应、血管效应及细胞效应等方面均发挥了广泛的作用^[4]。脓毒症所致急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)的病理生理机制复杂,其中就包括各种细胞异常凋亡,而肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)的异常凋亡是脓毒症时免疫抑制的主要特征之一,并与 ARDS 的高死亡率呈正相关^[5]。研究发现接受外源性 ghrelin 可以减轻 ARDS 动物的肺损伤并改善脓毒症预后^[6-7],已经证实这与 ghrelin 可以调节肺内皮细胞、上皮细胞等多种细胞的凋亡有关^[6-7],然而,ghrelin 对 AM 凋亡的影响及其分子机制仍然不明确。本实验以大鼠肺泡巨噬细胞系 NR8383 为模型,采用 CCK-8 法、流式细胞术、蛋白免疫印迹法等探讨 ghrelin 对 LPS 诱导的 NR8383 凋亡的影响及 JNK 信号通路在其中所起的作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大鼠肺泡巨噬细胞系 NR8383(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心),胎牛血清、F12K 培养基、Escherichia coli BioParticles, Alexa Fluor 488 conjugate(美国 Gibco 公司),ghrelin、SP600125、[D-Lys-3]-GHRP-6、LPS(美国 sigma 公司),Cell Counting Kit-8 试剂盒(日本同仁化学研究所),TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase

(TdT)-mediated dUTP nick end labeling)试剂盒(美国 Roche 公司), Annexin-V/PI 凋亡检测试剂盒(美国 BD pharmingen 公司),DAPI(美国 Invitrogen 公司), phospho-JNK、JNK、Bax、Bcl-2 和 cleaved caspase-3 抗体(美国 cell signal technology 公司),化学发光显影液(美国 Merck Millipore 公司),其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 CCK-8 法检测细胞增殖活性 取对数生长期的细胞加入 96 孔板中,每孔 100 μ L 培养基中含 6 000 个细胞,细胞经饥饿同步化处理后,进行以下分组处理:空白对照组为正常培养的 NR8383 细胞,培养基中不加 LPS 或 ghrelin;实验组则加入不同浓度的 LPS(5、10、15、20、25、30 μ g/mL)刺激细胞 8、24 和 48 h,找到 LPS 的 IC₅₀(half maximal (50%) inhibitory concentration)以及合适的刺激时间;用不同浓度的 ghrelin(0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nmol/L)预处理细胞 30 min 后再用 25 μ g/mL 的 LPS 刺激细胞 24 h;每组设三个复孔,药物处理结束之后,每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液,于 37 $^{\circ}$ C 体积分数为 CO₂ 培养箱中孵育 2 h,用酶标仪在 450 nm 波长测定各孔的吸光度值。细胞存活率=(实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值) $\times$ 100%。

1.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡率 将细胞以 1×10^6 /mL 接种于 6 孔板,饥饿同步化处理之后,根据分组情况进行不同药物处理:空白对照组(不加任何药物),LPS 处理组(LPS 终浓度为 25 μ g/mL),LPS+ghrelin 处理组(ghrelin 终浓度为 100 nmol/L,LPS 终浓度为 25 μ g/mL),ghrelin 处理组(ghrelin 终浓度为 100 nmol/L),LPS+ghrelin+[D-Lys-3]-GHRP-6 处理组(ghrelin 终浓度为 100 nmol/L,LPS 终浓度为 25 μ g/mL,[D-Lys-3]-GHRP-6 终浓度为 100 μ mol/L)。药物处理结束之后,PBS 洗涤两次,离心。加入 1 $\times$ 结合缓冲液调整细胞密度为 1×10^6 /mL,取 0.5 mL 细胞悬液,加入 5 μ L 的 AnnexinV-FITC 和 5 μ L 的 PI,避光,室温孵育 15 min,1 h 内用流式细胞仪(Beckton Dickinson)检测。用 Annexin V-FITC 和 PI 染色后,

正常的活细胞不被 Annexin V-FITC 和 PI 染色;凋亡早期的细胞仅被 Annexin V-FITC 染色,PI 染色呈阴性;坏死细胞和凋亡晚期的细胞可以同时被 Annexin V-FITC 和 PI 染色。

1.2.3 TUNEL 法 将多聚赖氨酸包被过的盖玻片置于 12 孔培养板中,取对数生长期的细胞种板,待细胞贴壁生长至密度约为 50% 左右之后,根据分组情况进行不同药物处理:空白对照组(不加任何药物),LPS 处理组(LPS 终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$),LPS+ghrelin 处理组(ghrelin 终浓度为 100 nmol/L,LPS 终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$),LPS+ghrelin+[D-Lys-3]-GHRP-6 处理组(ghrelin 终浓度为 100 nmol/L,LPS 终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,[D-Lys-3]-GHRP-6 终浓度为 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)。培养 24 h 后,用 40 g/L 的多聚甲醛溶液固定 30 min,PBS 缓冲液洗涤,然后按试剂盒说明操作,阳性细胞为细胞核染成绿色。随机选取光镜下 5 个视野,计算凋亡指数,凋亡指数=(凋亡细胞数/总细胞数)×100%。

1.2.4 蛋白免疫印迹法 取对数生长期的细胞种于 6 孔板,根据分组进行不同的药物处理,处理结束后收集各组细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰 PBS 洗涤 2 次,加入细胞裂解液 100 μL 裂解 15 min,13000 r/min ($r = 8.27 \text{ cm}$)离心 15 min,BCA 法定量蛋白,上样量定为 30 μg ,加入上样缓冲液后于 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下变性 10 min。聚丙烯酰胺 SDS 凝胶电泳后,电转移至硝酸纤维膜上,5%脱脂牛奶封闭 1 h,将膜在一抗溶液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min,在摇床上将膜于 HRP 标记的二抗溶液中室温孵育 1 h。TBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min,加入化学发光液,放入暗盒中并压片,2-5 min 后显影、定影。采用 ImageJ 软件测定蛋白条带灰度值,实验重复 3 次。

1.2.5 激光共聚焦检测细胞吞噬能力 将多聚赖氨酸包被过的盖玻片置于 12 孔培养板中,取对数生长期的细胞种板,待细胞贴壁生长至密度约为 50% 左右之后,根据分组进行不同的药物处理,培养 24 h 后,把用稀释好的荧光素标记的 E.coli 加入培养基,使 E.coli 与 NR8383 细胞的数量比为 20:1,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 2 h 后,去除培养基,加入 100 μL 的台盼蓝淬灭多余的 E.coli,PBS 洗涤后,于激光共聚焦显微镜下检测 NR8383 吞噬 E.coli 的能力,吞入的 Alexa Fluor 488 conjugate E.coli 呈绿色,胞内吞噬的绿色荧光颗粒越多,吞噬能力越

强。采用 Image Pro 软件进行荧光灰度值定量分析,灰度值越高,表明 NR8383 吞噬 E.coli 的数量越多,吞噬能力越强。

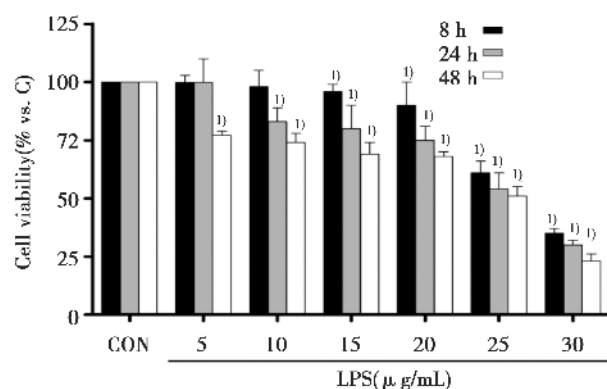
1.3 统计学分析

数据经 SPSS 13.0 软件进行统计分析,实验数据均以均数 $\pm$ 标准差表示,组间差异采用单因素方差分析(ANOVA)和 LSD- t 检验,以 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ghrelin 对 LPS 刺激 NR8383 增殖的影响

以 5、10、15、20、25、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 处理 NR8383 细胞 8 h、24 h 和 48 h 后,可以发现,与对照组相比,LPS 能够明显抑制 NR8383 的增殖,并呈现浓度依赖性和时间依赖性,LPS 的 IC_{50} 约为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 1)。用 ghrelin(0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nmol/L)预处理 30 min 后再用 LPS(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激细胞 24 h,细胞活力依次为(60.0 $\pm$ 7.1)%、(71.1 $\pm$ 2.5)%、(75.4 $\pm$ 2.1)%、(80.8 $\pm$ 6.3)%、(84.5 $\pm$ 8.1)%、(91.4 $\pm$ 6.1)%、(93.6 $\pm$ 7.1)%,其中 100 和 1000 nmol/L 的 ghrelin 预处理细胞后,其细胞活力与对照组相比无显著性差异,提示 100 和 1 000 nmol/L 浓度的 ghrelin 可以显著逆转 LPS 对 NR8383 增殖的抑制(图 2)。



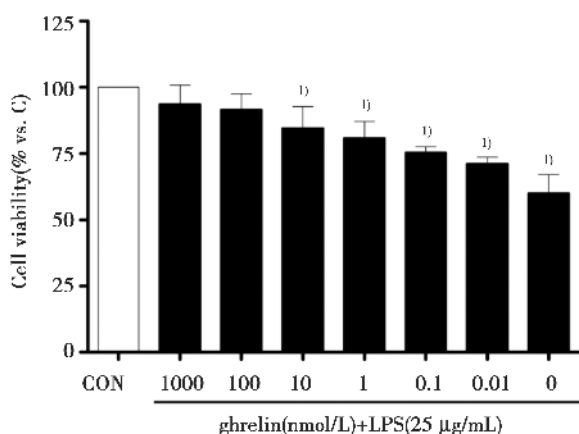
Mean $\pm$ SD. $n = 3$. 1) $P < 0.05$ compared with control

图 1 不同浓度 LPS 对 NR8383 细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of LPS on cell proliferation

2.2 ghrelin 对 LPS 诱导 NR8383 凋亡的影响

运用流式细胞仪检测细胞凋亡情况(图 3),结果显示空白对照组、LPS 处理组、LPS+ghrelin 处理组、ghrelin 处理组、LPS+ghrelin+[D-Lys-3]-



Mean $\pm$ SD. $n = 3$. 1) $P < 0.05$ compared with control.

图2 ghrelin 对 LPS 刺激下 NR8383 增殖的影响

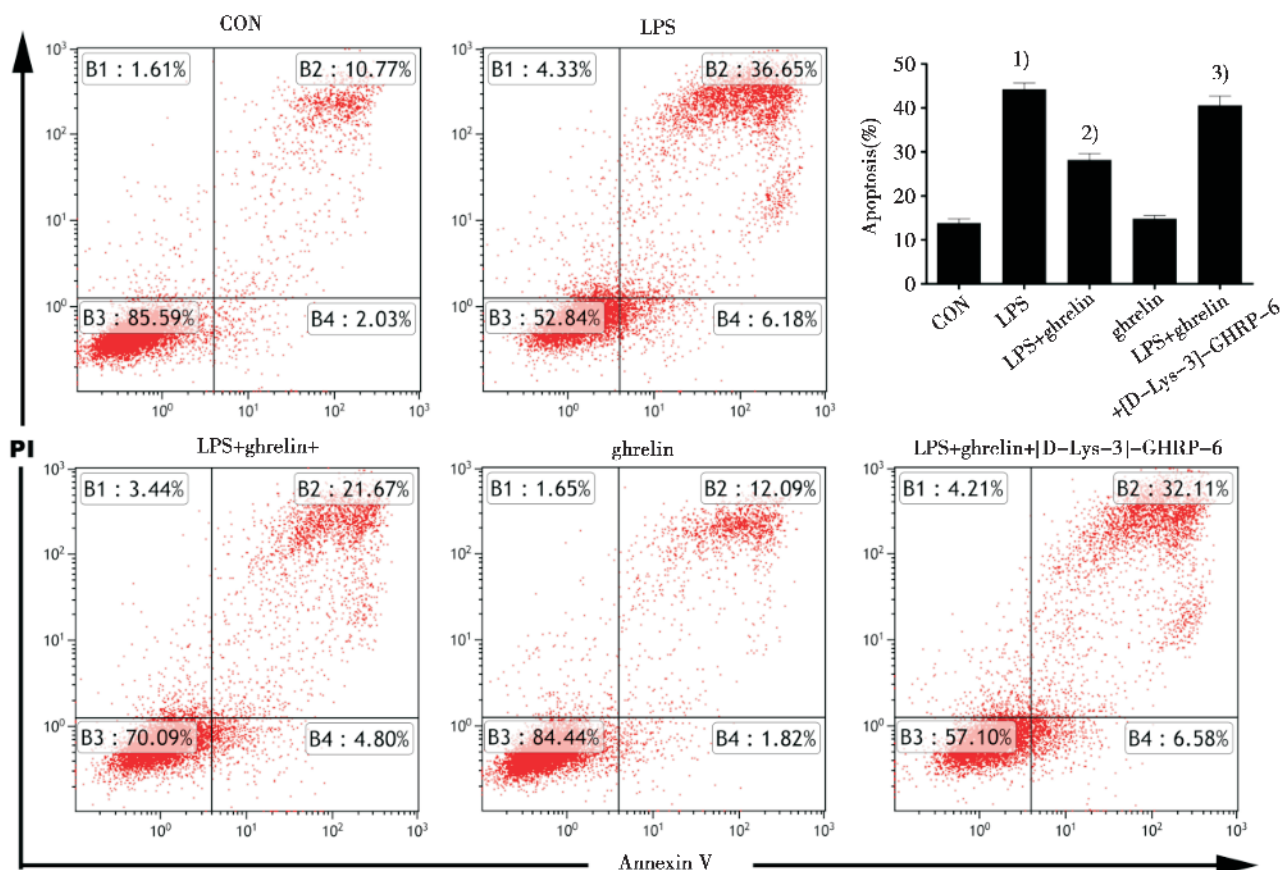
Fig.2 Effect of ghrelin on cell proliferation

GHRP-6 处理组的凋亡率依次为 $(13.8 \pm 1)\%$ 、 $(44.2 \pm 1.5)\%$ 、 $(28.1 \pm 1.5)\%$ 、 $(14.8 \pm 0.8)\%$ 、 $(40.5 \pm 2.2)\%$; TUNEL 结果显示空白对照组、LPS

处理组、LPS+ghrelin 处理组、LPS+ghrelin+[D-Lys-3]-GHRP-6 处理组的 TUNEL 阳性细胞率即凋亡指数分别为 $(30.9 \pm 1.3)\%$ 、 $(59.9 \pm 2.2)\%$ 、 $(38.4 \pm 4.8)\%$ 、 $(57.9 \pm 1.6)\%$ (图 4)。上述结果显示, LPS 处理组与空白对照组比较, 凋亡率和 TUNEL 阳性率都有显著升高 ($P < 0.05$), 证实 LPS 可以显著诱导 NR8383 发生凋亡; 而 ghrelin + LPS 处理组与 LPS 处理组比较, 无论是凋亡率还是 TUNEL 阳性率, 都有显著降低 ($P < 0.05$), 提示 ghrelin 对 LPS 诱导的 NR8383 凋亡有显著抑制作用; 而与 LPS+ghrelin 处理组比较, LPS+ghrelin+[D-Lys-3]-GHRP-6 处理组的凋亡率和 TUNEL 阳性率均有显著性增加 ($P < 0.05$), 提示 ghrelin 的抗凋亡效应或许是通过 NR8383 上的 ghrelin 受体起作用的。

2.3 ghrelin 对 LPS 刺激下 JNK 激酶及其下游凋亡相关蛋白表达的影响

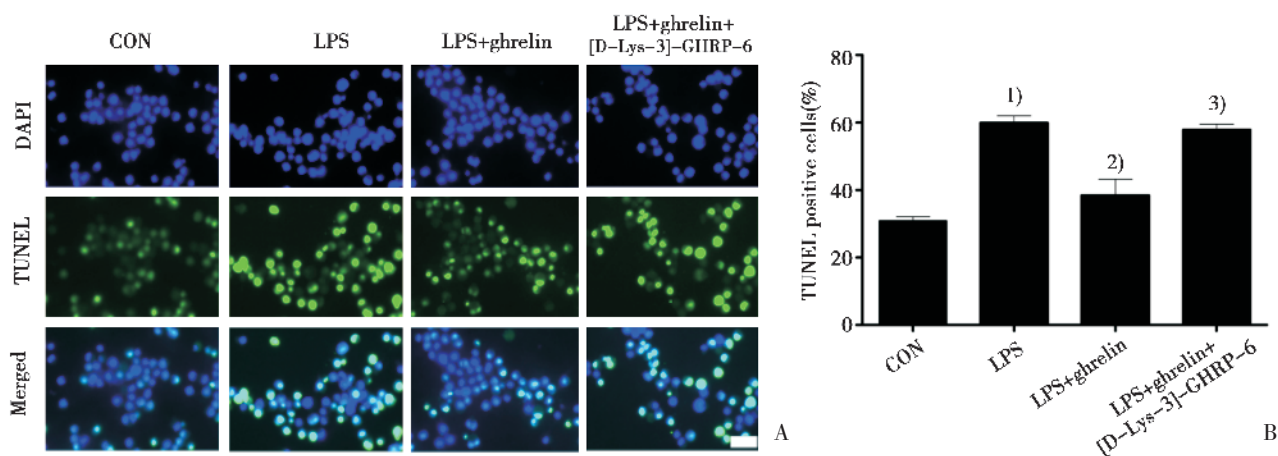
如图 5A 所示, 20、25、30 µg/mL 的 LPS 刺激 NR8383 细胞 8 h 后, 可以显著增强 JNK 的磷酸化



Mean $\pm$ SD. $n = 3$. 1) $P < 0.05$ compared with control; 2) $P < 0.05$ compared with LPS treated alone; 3) $P < 0.05$ compared with LPS plus ghrelin treatment.

图3 流式细胞技术检测各组 NR8383 细胞凋亡率

Fig.3 Effect of LPS and ghrelin on cell apoptosis by flow cytometry



Scale bar = 50 μ m. The bar graph shows the percentage of TUNEL-positive nuclei relative to DAPI-positive total nuclei. Mean $\pm$ SD. $n = 3$. 1) $P < 0.05$ compared with control; 2) $P < 0.05$ compared with LPS treated alone; 3) $P < 0.05$ compared with control.

图4 TUNEL 检测细胞凋亡情况

Fig.4 TUNEL analysis of NR8383 apoptosis

($P < 0.05$), 但是 LPS 对 JNK 的激活可以被 ghrelin 抑制(图 5B),并呈现一定的浓度依赖性。使用特异性 ghrelin 受体拮抗剂 [D-Lys-3]-GHRP-6 之后,ghrelin 对 JNK 激活的抑制作用显著减弱($P < 0.05$),再次提示 ghrelin 对 JNK 通路的抑制作用或许是通过 NR8383 细胞上的 ghrelin 受体起作用的(图 5C)。使用特异性的 JNK 抑制剂 SP600125,也可以显著抑制 LPS 对 JNK 的激活($P < 0.05$),但是 SP600125 和 ghrelin 之间对 JNK 通路的抑制并没有协同作用(图 5D),因为与单独使用 SP600125 和 ghrelin 相比,同时使用 SP600125 和 ghrelin 预处理细胞并没有显著减弱 JNK 的磷酸化水平。

如图 6A 和 6B 所示,随着 LPS 浓度的增加和作用时间的延长,JNK 通路下游重要的促凋亡蛋白 Bax 和 cleaved caspase-3 的表达水平较对照组有显著上调($P < 0.05$),而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达逐渐减弱($P < 0.05$),提示 LPS 对凋亡相关蛋白表达的改变呈现一定的浓度和时间依赖性。若用 ghrelin 预处理细胞,则 Bax、cleaved caspase-3 的上调以及 Bcl-2 的下调可以被显著逆转(图 6C)。以上结果提示,LPS 作用于 NR8383 后,可以显著激活 JNK 信号通路,这种激活可以被 ghrelin 阻断,继而影响到其下游凋亡相关蛋白的表达,起到影响 NR8383 凋亡的作用。

2.4 ghrelin 对 LPS 刺激下 NR8383 吞噬能力的影响

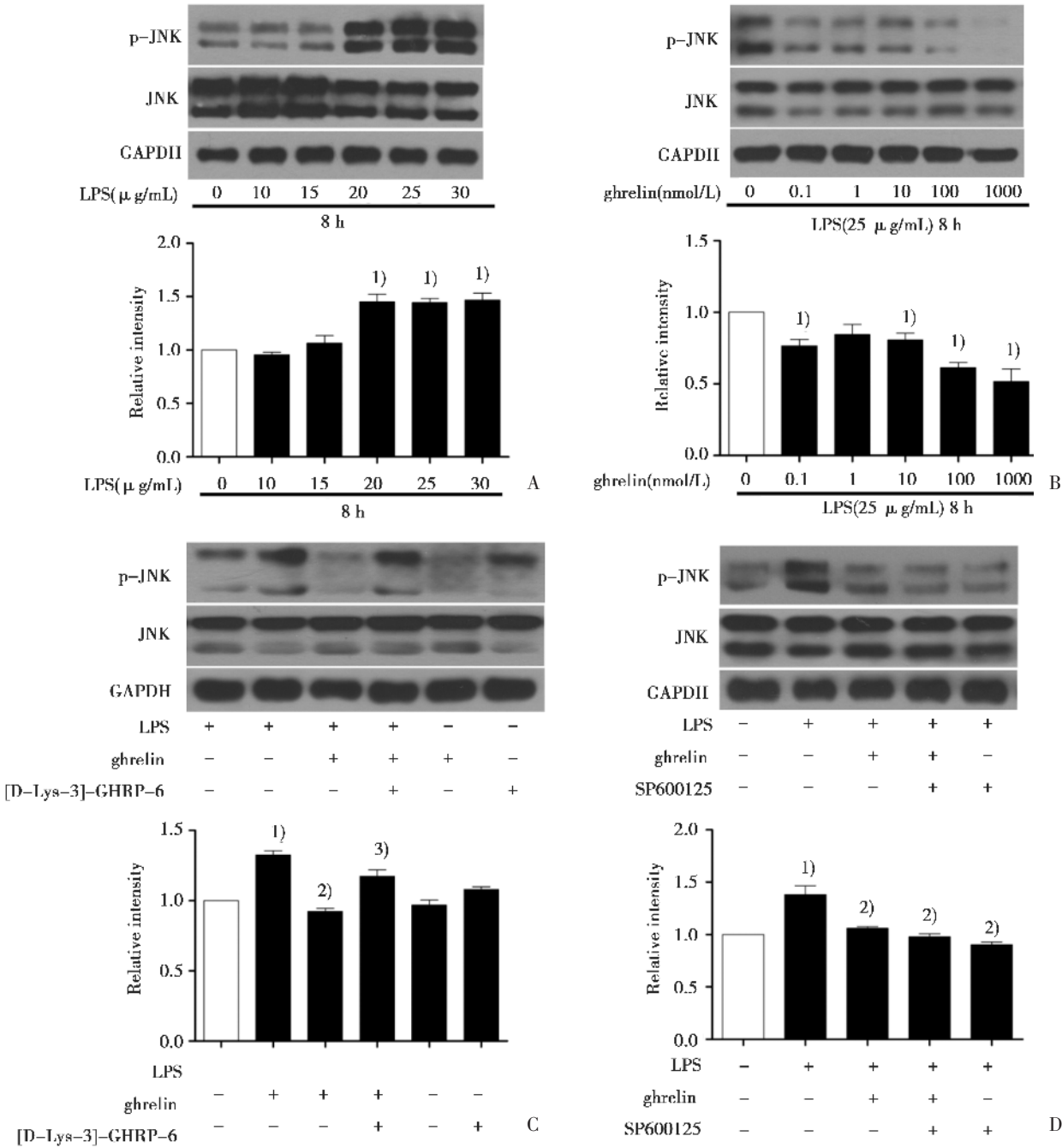
激光共聚焦显微镜结果显示,LPS 处理组的

荧光强度显著低于对照组,而 LPS + ghrelin 处理组的荧光强度显著高于 LPS 处理组($P < 0.05$),提示 LPS 持续刺激 NR8383 细胞 24h 之后其吞噬能力明显下降,而 ghrelin 可以在一定程度上维持 NR8383 细胞的吞噬能力(图 7)。

3 讨论

众所周知,AMs 可以早期识别入侵的病原体,继而启动肺内的免疫防御反应。例如,AM 通过吞噬肺内凋亡的中性粒细胞继而分泌抗炎细胞因子,如转化生长因子- β 和白细胞介素(IL)-10,防止进一步的组织损伤和炎症的扩展^[8]。然而,过去的研究显示,脓毒症时存在免疫抑制的现象^[9-10],AM 异常凋亡并失去产生炎症介质的能力是免疫抑制的主要特征之一^[9,11]。有研究者使用盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)建立大鼠败血症模型,发现与对照组相比,脓毒症早期和晚期 AM 的凋亡数量分别升高了 2.5 和 3.2 倍^[12]。我们的体外实验结果也显示,LPS 刺激 NR8383 细胞后,可以呈剂量和时间依赖的方式促进其凋亡。可见,越来越多的证据显示,AM 的功能或凋亡异常与脓毒症所致 ARDS 的发生发展有着密切联系^[5,12]。

现有研究证实 ghrelin 的生物作用广泛,包括调节细胞凋亡、增殖,改善血管通透性,调节免疫炎症等功能,其中 ghrelin 对细胞凋亡的保护作用成为近来研究的热门,许多体内外研究显示,ghrelin 可以抑制神经元、心肌细胞、内皮细胞、脂

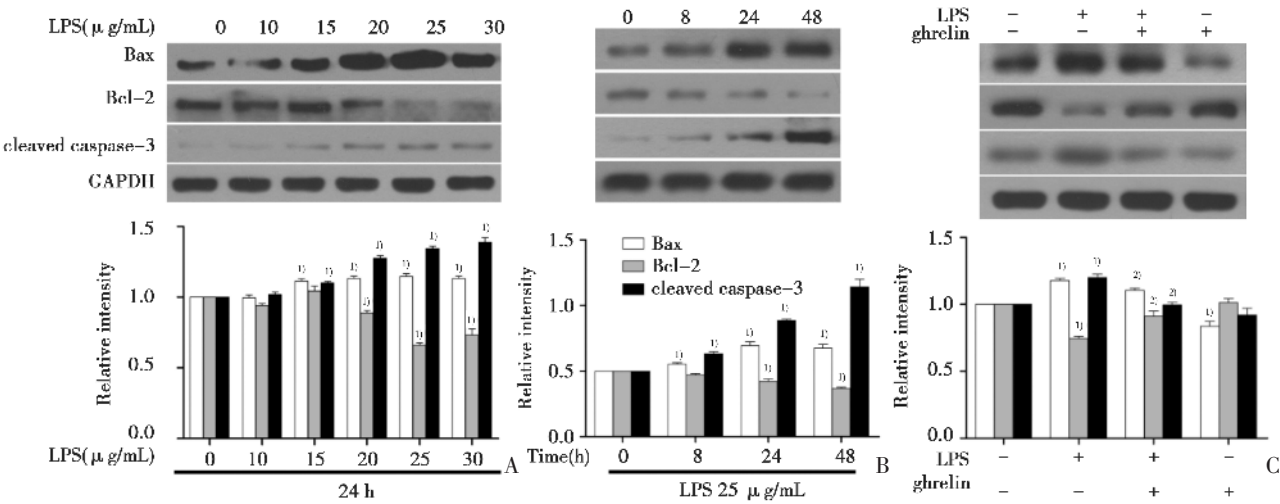


Mean $\pm$ SD. $n = 3$. 1) $P < 0.05$ compared with control; 2) $P < 0.05$ compared with LPS treated alone; 3) $P < 0.05$ compared with control.

图 5 Western blot 分析 LPS、ghrelin、[D-Lys-3]-GHRP-6、SP600125 对 NR8383 细胞 JNK、p-JNK 表达的影响
Fig.5 Effects of LPS and ghrelin on the expression of phospho-JNK and JNK in NR8383 by Western blot

肪细胞、胰岛细胞等多种细胞的凋亡^[13],并对许多肺部疾病的治疗有着积极效果,如肺气肿、慢性阻塞性肺疾病、肺囊性纤维化、肺炎等。我们的前期研究^[6]以及其他研究者的研究结果发现,脓毒症时肺组织内的 ghrelin 和 GHS-R 显著下调,此时若外源性给予 ghrelin 可以减轻肺损伤,增加肺组织内血流,下调促炎因子的表达,并提高脓毒症动物

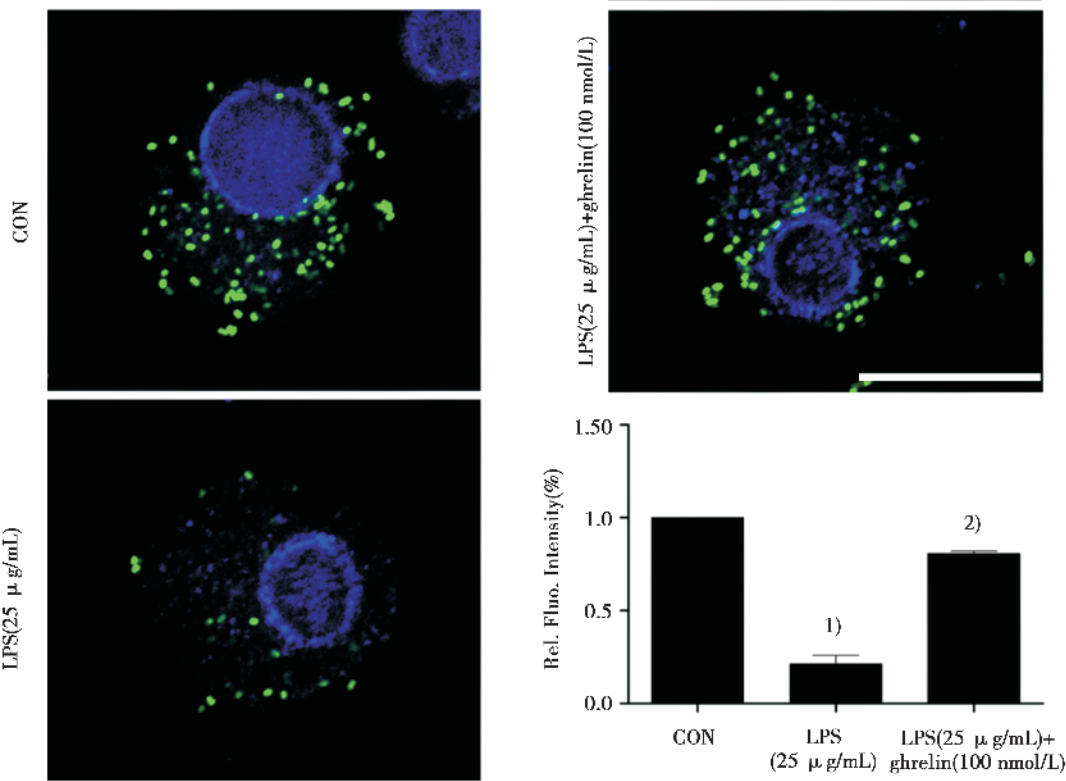
物的存活率,但是 ghrelin 这种保护作用的靶细胞以及分子机制仍不明确^[7]。既往研究显示 ghrelin 可在巨噬细胞内表达,我们通过 CCK-8、流式、TUNEL 等体外实验证实了用 ghrelin 预处理 NR8383 后,可以抑制 LPS 诱导的细胞凋亡。而且,ghrelin 的这种保护作用是通过其在 NR8383 上的受体起作用的,因为使用特异性的 ghrelin 受体拮



Mean ± SD. *n* = 3.1) *P* < 0.05 compared with control; 2) *P* < 0.05 compared with LPS treated alone.

图 6 Western blot 分析 LPS、ghrelin 对 NR8383 细胞 Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3 表达的影响

Fig.6 Effects of LPS and ghrelin on apoptosis related proteins expression in NR8383



Scale bar = 50 μm. Mean ± SD. *n* = 3. 1) *P* < 0.05 compared with control; 2) *P* < 0.05 compared with LPS treated alone.

图 7 激光共聚焦显微镜下观察 LPS 和 ghrelin 对 NR8383 吞噬功能的影响

Fig.7 Effect of LPS and ghrelin on phagocytosis in NR8383

抗剂[D-Lys-3]-GHRP-6 之后,ghrelin 的抗凋亡作用显著减弱。再者,我们发现 ghrelin 可以在一定程度上维持 LPS 持续刺激下 NR8383 的吞噬能力,这对 AM 通过吞噬病原菌、衰老或凋亡的细胞从而发

挥强大的抗感染免疫能力有着积极的影响。由此我们推断,ghrelin 对 AM 的抗凋亡作用或许是 ghrelin 减轻脓毒症所致急性肺损伤的保护机制之一。

为了进一步了解 ghrelin 抑制 NR8383 凋亡的

分子机制,我们研究了 JNK 信号转导通路在其中扮演的作用。JNK 激酶是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)家族的一员,有报道称在 LPS 诱导的巨噬细胞凋亡时 JNK 出现显著活化^[14],此外,JNK 信号通路可以接受各种不同的细胞外信号被激活,调节细胞增殖、分化、凋亡。JNK 被磷酸化激活之后,可继续以磷酸化或其他形式激活下游的蛋白,包括 c-Jun 和 Bcl-2 家族等,而 Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡信号转导中起着重要的调节作用,例如 Bax/Bcl-2 的比例失衡可以引起细胞线粒体膜电位改变和线粒体细胞色素释放,激活 caspase 家族蛋白,最终导致凋亡的发生^[15]。已经有研究报道,脓毒症时促凋亡蛋白 Bax 表达上调和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调。我们的结果显示,LPS 可以激活 JNK 磷酸化,继而引起 Bax、cleaved caspase-3 的上调以及 Bcl-2 的下调,而 ghrelin 可以抑制 LPS 引起的 JNK 磷酸化,并逆转 Bax、cleaved caspase-3 的上调以及 Bcl-2 的下调,这与 ghrelin 在其他种类细胞中的抗凋亡作用机制有着相似之处。

综上所述,我们的研究表明,ghrelin 可以通过抑制 JNK 的磷酸化,保持 Bax 和 Bcl-2 的平衡,并抑制 cleaved caspase-3 的表达,最终对 LPS 诱导的 NR8383 的凋亡起到明显抑制作用,并且对 NR8383 的吞噬功能起着一定的维持作用。

参考文献

- [1] Date Y, Kojima M, Hosoda H, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(11): 4255-4261.
- [2] Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(6): 2988.
- [3] Demers A, Caron V, Rodrigue-Way A, et al. A concerted kinase interplay identifies PPARgamma as a molecular target of ghrelin signaling in macrophages [J]. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7728.
- [4] Cao Y, Tang J, Yang T, et al. Cardioprotective effect of ghrelin in cardiopulmonary bypass involves a reduction in inflammatory response [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55021.
- [5] Jones HD, Crother TR, Gonzalez-Villalobos RA, et al. The NLRP3 inflammasome is required for the development of hypoxemia in LPS/mechanical ventilation acute lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50(2): 270-280.
- [6] Zeng M, He W, Li L, et al. Ghrelin Attenuates Sepsis-Associated Acute Lung Injury Oxidative Stress in Rats [J]. *Inflammation*, 2014, Jul 19. [Epub ahead of print].
- [7] Wu R, Dong W, Zhou M, et al. Ghrelin attenuates sepsis-induced acute lung injury and mortality in rats [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176(8): 805-813.
- [8] El KD, Gjorstrup P, Filep JG. Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(37): 14983-14988.
- [9] Reddy RC, Chen GH, Tekchandani PK, et al. Sepsis-induced immunosuppression: from bad to worse [J]. *Immunol Res*, 2001, 24(3): 273-287.
- [10] Deng JC, Cheng G, Newstead MW, et al. Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(9): 2532-2542.
- [11] Steinhäuser ML, Hogaboam CM, Kunkel SL, et al. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense [J]. *J Immunol*, 1999, 162(1): 392-399.
- [12] Lu MC, Liu TA, Lee MR, et al. Apoptosis contributes to the decrement in numbers of alveolar macrophages from rats with polymicrobial sepsis [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2002, 35(2): 71-77.
- [13] Zhan M, Yuan F, Liu H, et al. Inhibition of proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells by ghrelin [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008, 40(9): 769-776.
- [14] Janes KA, Albeck JG, Peng LX, et al. A high-throughput quantitative multiplex kinase assay for monitoring information flow in signaling networks: application to sepsis-apoptosis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2(7): 463-473.
- [15] Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword [J]. *Cell Res*, 2005, 15(1): 36-42.

(编辑 孙慧兰)