第41卷 第3期
2016年3月

贵 阳 医 学 院 学 报
JOURNAL OF GUIYANG MEDICAL COLLEGE

Vol.41 No.3
2016.3

布洛芬对MyD88基因沉默中性白细胞中NF-kB蛋白表达的影响*

任 飞，王婷婷，王春雷**
（中国医科大学附属第一医院 老年医学科，辽宁 沈阳 110001）

[**摘　要**] **目的**：研究布洛芬对脂多糖（LPS）介导的MyD88基因沉默中性白细胞中一氧化氮（NO）产生能力和TLR4-NF-kB通路中核转录因子kB（NF-kB）蛋白表达的影响。**方法**：用密度梯度法分离正常健康者外周血中性白细胞并用免疫磁珠纯化，用Nucleofection转染系统将MyD88 siRNA基因转染入纯化后的中性白细胞；用0、5、10、50及100 μmol/L布洛芬联合1 mg/L LPS分别刺激正常中性白细胞和已转染的MyD88基因沉默的中性白细胞，用流式细胞仪检测已沉默MyD88基因的中性白细胞中NO水平，用Western Blot检测MyD88和NF-kB蛋白表达水平。**结果**：不同浓度的布洛芬均可以明显抑制正常中性白细胞和MyD88基因沉默中性白细胞产生NO，并呈剂量依赖，50 μmol/L布洛芬浓度时抑制率最高；正常人中性白细胞MyD88和NF-κB的表达水平也随布洛芬浓度升高而降低，50 μmol/L布洛芬时对MyD88和NF-κB的抑制率最高；选择50 μmol/L布洛芬处理正常中性白细胞和MyD88基因沉默的中性白细胞，可明显抑制正常和MyD88基因沉默中性白细胞中MyD88-和NF-κB蛋白的表达，与仅加LPS组比较，差异有统计学意义（$P<0.01$）；正常细胞和MyD88基因沉默细胞之间产生NO水平和MyD88-、NF-κB蛋白的表达水平比较$P>0.05$。**结论**：布洛芬可抑制LPS介导的MyD88基因沉默中性白细胞中NO产生，其机制可能与下调MyD88和NF-κB蛋白水平有关。

[**关键词**] 布洛芬；核因子-κB；MyD88；基因沉默；中性白细胞
[**中图分类号**] R34-33　[**文献标识码**] A　[**文章编号**] 1000-2707(2016)03-0310-04

Effect of Ibuprofen on Protein Expression of NF-κB in MyD88-knockdown Human Neutrophils

REN Fei, WANG Tingting, WANG Chunlei
(*Department of Geriatrics, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To explore the effect of ibuprofen on NO production in LPS mediated MyD88 knockdown human neutrophils and NF-kB protein expression in TLR4-NF-κB pathway. **Methods**: Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation was adopted to isolate the neutrophils from the peripheral blood of healthy people and Easysep Neutrophil Enrichment Kit was used to purify neutrophils. Nucleofection technology was adopted to transfer MyD88 siRNA into the purified neutrophils. The cells were inbucated with ibuprofen (5 μmol/L, 10 μmol/L, 50 μmol/L and 100 μmol/L) combined with 1mg/L LPS respectively to stimulate normal neutrophils and transfected MyD88 gene-silencing neutrophils. Flow cytometry was adopted to detect NO level in MyD88 gene-silencing neutrophils and Western Blot was used to detect protein expression level of MyD88 and NF-kB. **Results**: Different concentration of ibuprofen could significantly inhibit NO produced by normal neutrophils and transfected MyD88 gene-silencing neutrophils in dose-dependent way, with 50 μmol/L of ibuprofen showing the highest inhibition rate. The protein expression level of MyD88 and NF-kB in normal neutrophils decreased with the

*[基金项目]辽宁省教育厅高校科研基金资助项目(2010686)
**通信作者 E-mail：wcl201010@163.com
网络出版时间：2016-03-17　网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160317.1044.038.html

increase of ibuprofen concentration, with 50 μmol/L of ibuprofen showing the highest inhibition rate for protein expression level of MyD88 and NF-kB. 50 μmol/L of ibuprofen was selected to stimulate normal neutrophils and transfected MyD88 gene-silencing neutrophils and significantly inhibit protein expression level of MyD88 and NF-kB. Compared with only LPS group, the differences were statistically significant ($P < 0.01$). There was no significant difference in NO level and protein expression level of MyD88 and NF-kB between normal neutrophils and transfected MyD88 gene-silencing neutrophils ($P > 0.05$). **Conclusion**: Ibuprofen can inhibit LPS-mediated NO produced from MyD88 gene-silencing neutrophils and the possible mechanism may be related to down-regulation of protein expression of MyD88 and NF-κB.

[**Key words**] ibuprofen; nuclear factor-κB; MyD88; gene silence; knock-down; neutrophils

布洛芬(异丁苯丙酸,Ibuprofen)为非甾体类解热镇痛药、其消炎、镇痛、解热作用显著,不良反应较小,在世界范围内得到广泛应用。有研究发现,布洛芬可缓解博莱霉素诱导的肺纤维化,其机制与抑制一氧化氮(nitrite oxide,NO)的产生和调控 toll 样受体 4(toll like receptor, TLR4)有关,布洛芬可通过下调博莱霉素诱导的肺纤维化鼠肺泡灌洗液中 MyD88 的蛋白表达水平,从而降低 NO 含量、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白介素-6(IL-6)等炎症因子的含量,减轻肺纤维化[1]。中性白细胞的 TLR4 主要通过依赖 MyD88 途径和非依赖 MyD88 途径(即 TRIF 途径)起作用[2-3],其中 MyD88 是 TLR 信号通路中关键的转接分子[4-6]。无论是 MyD88 依赖性途径还是非 MyD88 依赖性途径均可激活 NF-κB 和 MAPK 信号通道,引起一系列的炎症介质反应[7-9]。本研究通过沉默中性白细胞中 MyD88 基因,用不同浓度的布洛芬和 LP 处理细胞,探讨布洛芬对抑制 MyD88 基因沉默中性白细胞产生 NO 能力及对 MyD88 依赖性或 MyD88 非依赖性途径和其下游 NF-kB 调控的关系。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

布洛芬购自烟台第二制药厂,Human Neutrophil Enrichment Kit 购自 Stemcell (Vancouver, Canada),纯化 LPS 购自 Invivogen (San Diego, CA, USA)。MyD88 GeneSolution siRNA 购自 QIAGEN (Cambridge, MA, USA),MyD88 和 NF-kB 抗体购自 Cell Signaling (Beverly, MA, USA),Ficoll 购自 GE (Pittsburgh, PA, USA),RPMI 1640 培养基购自(fetal bovine serum, FBS),小牛血清购自 Hyclone (Logan, UT, USA)。

1.2　分离和纯化中性粒细胞

取健康人新鲜抗凝静脉血 20 mL,与 PBS 1∶1 混匀稀释,按 2∶1 加于淋巴细胞分离液;2 000 r/min 离心 20 min,弃去第 1 层血浆层和第 2 层细胞层,收集第 3 层分离液层和第 4 层红细胞层,加入 5 mL PBS 充分混匀,1 000 r/min 离心 10 min,吸弃上清液,收集细胞沉淀,加入 6 ~ 10 倍细胞体积的红细胞裂解液,轻轻吹打混匀,裂解红细胞 10 min。400 ~ 500 r/min 离心 5 min,弃红色上清。加入适量 PBS 重悬沉淀,400 ~ 500 r/min 离心 3 min,弃上清液,收集细胞沉淀,按 5×10^7 个细胞给予 10 μL 的磁珠抗体进行隐形筛选纯化细胞,得到中性白细胞。

1.3　沉默 MyD88 基因

使用 Nucleofection (Amaxa, Germany)转染系统。细胞沉淀用 100 μL 转染液重悬(细胞浓度约为 1×10^6)并转移到 1.5 mL 转染杯中,加入 MyD88 Gene solution siRNA 5 μL 混匀,调节转染仪为优化状态完成转染。通过阳性对照的荧光标记,应用流式细胞仪鉴定转染效率约为 70%。对照组也进行相同的转染过程,以排除转染过程对实验的影响。细胞在培养液中孵育 2 h 备用。

1.4　分组及布洛芬处理细胞

将布洛芬配成 10 mmol/L 的储存液,每次试验时配成终浓度(现用现配)为 5、10、50 及 100 μmol/L 应用液。将沉默 MyD88 基因的中性白细胞和正常中性白细胞沉淀用 PMI1640 培养液重悬,均分别均分为 5 份接种到 24 孔板,分别为 LPS 组(未加布洛芬)、LPS + 5 μmol/L 布洛芬组、LPS + 10 μmol/L 布洛芬组、LPS + 50 μmol/L 布洛芬组和 LPS + 100 μmol/L布洛芬组,5 组均分别给予 1mg/L LPS 刺激细胞。将所处理过的细胞置于 37 ℃,5% CO_2 的细胞培养箱中 30 min 后,进行相应检测。

1.5　NO 浓度检测

采用流式细胞仪，应用 2′,7′-二氯荧光黄双乙酸盐（2，7-Dichlorodihy-drofluorescein diacetate，DCFH-DA）可以自由通过细胞膜进入胞内，被酯酶水解成 DCFH，DCFH 与胞内活性氧（reactive o xygen species，ROS）ROS 反应生成 7′二氯荧光素（7′-Dichlorofluorescein，DCF），DCF 被 488 nm 激光器激发后能发出 530 nm 的荧光信号，被异硫氰酸荧光素（FITC）通道接受换算成 NO 浓度。在各组的细胞悬液中加入 DCFH-DA 1 mL，使其终浓度为 10 μmol/L，孵育 30 min；PBS 终止反应，离心并重悬细胞，立刻使用流式细胞仪检测，以 LPS 组产生的 NO 浓度作为 100%，计算各组产生 NO 的百分率。

1.6　MyD88 和 NK-κB 蛋白表达

采用 western blot 方法，细胞沉淀经细胞裂解液 100 μL 裂解后，12 000 r/min 离心 30 min，用碱性酚法测定上清液的蛋白浓度并调制相同的总蛋白浓度。蛋白样品按 4∶1加入上样缓冲液，煮沸 5 min；各取 15 μL 蛋白样品，经 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离，并以湿转法转到 PVDF 膜上；在室温下用 5% 的脱脂奶粉进行封闭 2 h，并用 TBST 洗涤 3 次，然后用 5% 的 BSA 抗体缓冲液按 1∶1 000 稀释抗体（分别为 MyD88 和 NF-κB 抗体），孵育 PVDF 膜，过夜；然后洗涤 3 遍，进行二抗孵育 2 h。将膜洗涤 3 次后，ECL 发光后用图像分析仪进行图像分析。

2　结果

2.1　NO 水平

从图 1 可以看出不同浓度的布洛芬均可以明显抑制正常中性白细胞和 MyD88 基因沉默中性白细胞产生 NO，并呈剂量依赖，处理的布洛芬浓度越高抑制能力越强，在 50 μmol/L 布洛芬浓度时抑制率最高。布洛芬抑制 MyD88 基因沉默中性白细胞产生 NO 能力强于正常中性白细胞，但差异无统计学意义（$P > 0.05$）。

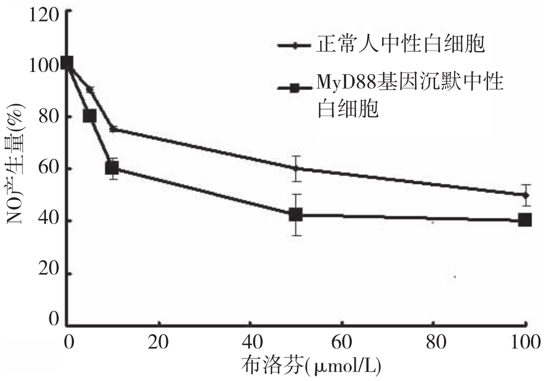

图 1　布洛芬对两种中性白细胞产生 NO 能力的影响

Fig. 1　The effect of ibuprofen on NO production ability in normal neutrophils and MyD88 gene-silencing neutrophils

2.2　MyD88 和 NF-κB 蛋白表达

结果表明，布洛芬均可抑制正常人中性白细胞 MyD88 和 NF-κB 的表达，呈剂量依赖性，50 μmol/L 布洛芬时抑制率最高，对 MyD88 抑制率约为 50%、NF-κB 为 90%，见图 2。故选择 50μmol/L 布洛芬处理组研究布洛芬对 MyD88 基因沉默中性白细胞的 MyD88 和 NF-κB 蛋白表达的影响，如图 3 所示，50 μmol/L 布洛芬可明显抑制正常和 MyD88 基因沉默中性白细胞中 MyD88-和 NF-κB 蛋白的表达；与仅加 LPS 刺激比较，差异有统计学意义（$P < 0.01$）；而正常细胞和 MyD88 基因沉默细胞中 MyD88 和 NF-κB 蛋白表达的抑制率比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。

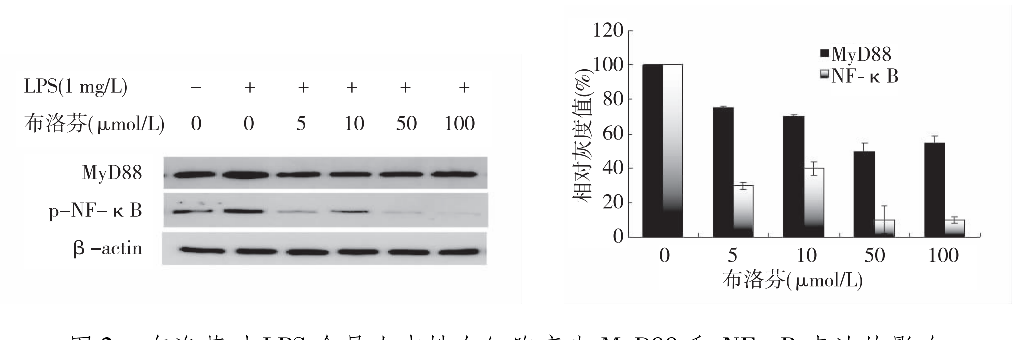

图 2　布洛芬对 LPS 介导人中性白细胞产生 MyD88 和 NF-κB 表达的影响

Fig. 2　The effect of ibuprofen on MyD88 and NF-kB expression in human neutrophils mediated by LPS

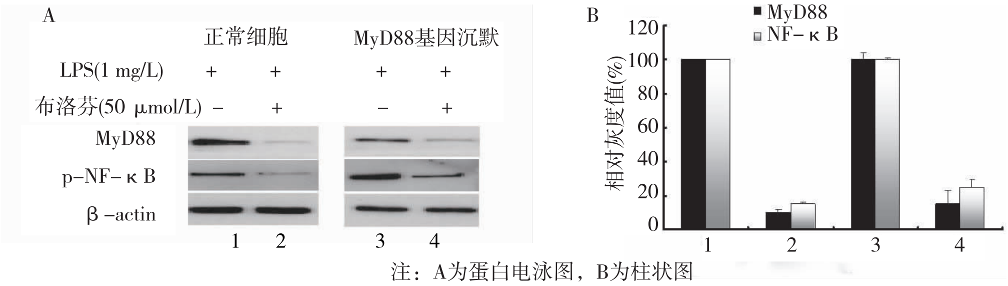

图 3　布洛芬对正常和 MyD88 基因沉默中性白细胞 MyD88 和 NF-κB 表达的影响

Fig. 3　The effect of ibuprofen on MyD88 and NF-kB expression in normal neutrophils and MyD88 gene-silencing neutrophils

3　讨论

MyD88 是 TLR 信号通路中关键的转接分子，TLR4 是单一的 TLR 受体，通过 2 条途径激活，一是依赖 MyD88 途径，另一是非依赖 MyD88 途径（即 TRIF 途径）[2]。无论是 MyD88 依赖性还是非 MyD88 依赖性途径均可激活 NF-κB 通道和 MAPK 通道。TLR4 与炎症相关性疾病之间有着密切的联系，大量的研究显示 TLR4/NF-κB 信号通路在炎症信号的传递中发挥着重要作用[6]。其中 NF-κB 诱导激酶激活 I-κB 家族 α、β 激酶，导致 I-κB 家族的广泛磷酸化而降解，激活并最终启动 TNF-α、IL-6、IL-8 和 IL-12 等细胞因子以及辅助刺激分子 CD80、CD83 和 CD86 基因的转录，产生相应的生物效应[10]。Konstan 等[11]研究证实长期服用布洛芬胶囊，血浆浓度波动在 8 ~ 90 μmol/L，平均血药峰浓度可以达到 50 μmol/L，此剂量可有效减缓囊性纤维化患者肺部疾病的进展，并可制嗜中性白细胞迁移到肺。因此选用 5 ~ 100 μmol/L 浓度布洛芬用于本次研究。在哺乳动物体内，NO 是 L-精氨酸在一氧化氮合酶（NOS）催化下生成的，虽生成的 NO 量较少，但具有广泛的生理功能，NO 具有调节血压、扩张血管及抑制血小板聚集等作用，在防止心血管疾病的发生发展方面发挥重要的保护作用。本研究用流式细胞仪观察布洛芬对 LPS 介导人中性白细胞产生 NO 的能力，结果证明 50 μmol/L 布洛芬就能明显抑制 NO 的产生，抑制能力达到最大。结果还显示布洛芬呈剂量依赖性抑制正常人中性白细胞 MyD88 和 NF-κB 的表达，结果与布洛芬抑制 NO 的产生一致，即 50 μmol/L 布洛芬即可产生有效抑制作用。因此，本研究用 50 μmol/L 布洛芬处理 MyD88 基因沉默中性白细胞后检测其 MyD88 和 NF-κB 的表达，发现对 MyD88 基因沉默中性白细胞，布洛芬的作用更加明显，说明布洛芬可能部分通过 MyD88 的下调，抑制 NF-κB 的表达，从而降低 NO 的产生。综上，布洛芬可抑制 LPS 介导的 MyD88 基因沉默中性白细胞中 NO 产生，可能与下调 MyD88 和 NF-κB 蛋白水平有关。对于布洛芬是否影响非依赖性 MyD88 通道，有待于进一步研究证实。

4　参考文献

[1] 王春雷，吕飞. 布洛芬抑制博莱霉素诱导的肺纤维化小鼠一氧化氮生成的机制研究[J]. 中国血液流变学杂志，2012（3）：421 – 438.

[2] Krishnanl J，Selvarajoo K，Tsuchiya M，et al. Toll-like receptor signal transduction[J]. Experimental and molecular medicine，2007（4）：421 – 438.

[3] 王娜，张雪梅，陈立杰. TLR4 信号通路与炎症相关性疾病[J]. 中国实验诊断学，2015(5)：857 – 860.

[4] Casanova JL，Abel L，Quintana-Murci L. Human TLRs And IL-1Rs in host defense：Natural Insights from Evolutionary，Epidemiological，and Clinical Genetics[J]. Annual Review of Immunology，2011(29)：447 – 491.

[5] Browm J，Wang H，Hajishengallis GN，et al. TLR-signaling net-works：an integration of a daptor molecules，kinase，and cross-talk[J]. J Dent Res，2011（4）：417 – 427.

[6] Jeong E，Lee JY. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors[J]. Yonsei Med J，2011(52)：379 – 392.

[7] Jin B，Sun T，Yu XH，et al. The efects of TLR activation on T-cell development and diferentiation[J]. Clin Dev Immunol，2012(2012)：836485.

[8] van Bruggen R，Drewniak A，Tool ATJ，et al. Toll-like receptor responses in IRAK-4-deficient neutrophils[J]. J Innate Immun，2010（1）：280 – 287.

（下转第 329 页）

国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨志, 2012 (8):485 - 508.
[3] 桂坤,杜娟. 77 例老年肺结核临床特点分析[J]. 贵阳医学院学报, 2004(5):438 - 439.
[4] 陈建,李宁秀,万康林,等. 四川和安徽两省结核耐药危险因分析[J]. 四川大学学报:医学版, 2007 (1):135 - 137.
[5] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程[J]. 中国防痨杂志, 1996(1):28 - 31.
[6] Merza MA, Farnia P, Tabarsi P, et al. Anti-tuberculosis drug resistance and associated risk factors in a tertiary level TB center in Iran: a retrospective analysis [J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2011(7): 511 - 519.
[7] Lomtadze N, Aspindzelashvili R, Janjgava M, et al. Prevalence and risk factors for multidrug-resistant tuberculosis in the Republic of Georgia: apopulation-based study[J]. International Journal of Tuberculosis, 2009(1):68 - 73.
[8] Liu Q, Zhu LM, Shao Y, et al. Rates and risis factors for drug resistance tuberculosis in northeastern china [J]. BMC public Health, 2013(13):1171.
[9] Githui WA, Hawken MP, Juma ES, et al. Surveillance of drug-resistant tuberculosis and molecular evaluation of transmission of resistant strains in refugee and non-refugee populations in North-Eastern Kenya[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2000(10):947 - 955.
[10] 王勐,吴琍敏,王乐,等. 杭州市耐多药结核病的危险因素定性研究[J]. 疾病监测, 2014(5):373 - 378.
[11] 梁冰,魏运金,伍红,等. 复治涂阳肺结核患者耐药特点及相关因素分析[J]. 广东医学, 2013(2):277 - 279.
[12] Kim HJ, Kang CH, Kim YT, et al. Prognostic factors for surgical resection in patients with multidrug-resistant tuberculosis [J]. European Respiratory Journal, 2006 (3):576 - 580.
[13] 孟素艳,范梦柏,王晶晶,等. 肺结核患者结核病耐药性危险因素分析[J]. 中国公共卫生杂志, 2012(2): 241 - 242.
[14] 王胜芬,赵冰,宋媛媛,等. 我国耐药结核病的危险因素 - 2007 年全国结核病耐药基线调查资料分析[J]. 中国防痨杂志, 2013(4):221 - 226.
[15] 黄曙海,蓝如束,刘飞鹰,等. 广西壮族自治区肺结核耐药性调查及复治患者耐药相关因素分析[J]. 中国防痨杂志, 2013(9):711 - 717.
[16] Alisjahbana B, Sahiratmadja E, Purwa A, et al. The effect of type 2 diabetes mellitus on the presentation and treatment response of pulmonary tuberculosis[J]. CIin Infect Dis, 2007(4):428 - 435.

(2015-12-10 收稿,2016-02-23 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周　凌

(上接第 313 页)

[9] Calil IL, Zarpelon, Ana C, et al. Lipopolysaccharide Induces Inflammatory Hyperalgesia Triggering a TLR4/MyD88-Dependent Cytokine Cascade in the Mice Paw. [J]PLoS One, 2014 (3)1 - 8.
[10] Gil R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors [J]. Free Radic Biol Med, 2010(9):1121 - 1132.
[11] Konstan MW, Krenicky JE, Finney MR, et al. Effect of Ibuprofen on Neutrophil Migration in Vivo in Cystic Fibrosis and Healthy Subjects[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2003(3):1086 - 1091.
[12] 邓次妮,沈潞华. 一氧化氮合酶/一氧化氮系统与心血管疾病[J]. 心血管病学进展, 2007(4):603 - 607.

(2015-12-25 收稿,2016-02-08　修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘　华