

· 论 著 ·

抗体芯片分析氯喹对巨噬细胞炎症细胞因子分泌的影响

王艳艳

(成都军区总医院检验科, 成都 610083)

摘要:目的 利用抗体芯片分析氯喹对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 经细菌内毒素(LPS)刺激后炎症细胞因子分泌的影响。方法 体外培养单核-吞噬细胞系 RAW264.7, 用生物素分别标记从空白组、LPS 处理组、氯喹处理组及氯喹加 LPS 处理组细胞中提取的总蛋白, 然后与预先点有 40 个主要炎症细胞因子的特异性抗体的抗体芯片膜反应, 目标蛋白与辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗链霉素生物素抗体结合并曝光显示反应信号, 最后用激光扫描仪将其转化为图像文件进行分析。结果 与 LPS 处理组比较, 氯喹加 LPS 处理组炎症细胞因子的表达呈现低表达。结论 氯喹对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子的分泌具有抑制作用。

关键词:氯喹; 内毒素类; 抗体芯片; 细胞因子类

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.03.003

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)03-0214-02

Effects of chlorquine on inflammatory cytokines secretion from mouse macrophages by antibody chips

Wang Yanyan

(Department of Clinical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of chlorquine on inflammatory cytokines secretion from mouse macrophages by antibody chips. **Methods** Proteins from the RAW 264.7 cells in LPS group, chlorquine group, both chlorquine and LPS group, and a control group were labeled with biotin. The biotin-labeled proteins reacted with antibody chips on which the antibodies of 40 major inflammatory cytokines were prepared. The target proteins were conjugated with streptomycin antibody labeled with horseradish peroxidase(HRP), and signals were imaged by laser scanner. **Results** Compared with the LPS group, the levels of inflammatory cytokines of chlorquine group were notably decreased. **Conclusion** Antibody chips demonstrate chlorquine can significant inhibit inflammatory cytokines secretion from mouse macrophages induced by LPS.

Key words: chlorquine; endotoxins; antibody chips; cytokines

脓毒症是由感染因素介导的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 是严重创伤、烧伤及大手术后患者的常见并发症, 进一步发展可导致休克和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 严重威胁患者生命^[1]。细菌内毒素(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌外膜结构中的主要成分, 研究发现, LPS可活化单核-吞噬细胞系统, 诱导大量炎症细胞因子释放, 介导脓毒症的发生^[2]。目前, 国际上针对 LPS 介导的 SIRS 尚无有效的防治措施, 已成为当前研究的焦点之一。因此, 寻找有效拮抗内毒素的措施具有重要的意义^[3-4]。氯喹具有抗炎作用, 但具体作用机制尚不明确。本研究以小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 为研究对象, 观察氯喹预处理后 LPS 刺激对 RAW264.7 细胞因子分泌的影响, 为氯喹在临床上有效防治 SIRS 提供实验依据。

1 材料与与方法

1.1 试剂 LPS(O55:B5), 氯喹为美国 Sigma 公司产品, 细胞因子抗体芯片为美国 RayBio 公司产品, TRIZOL BCA 蛋白质定量试剂盒购自上海康成生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 用 6 孔培养板加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中。按实验设计将培养细胞分成 4 组: (1) 空白组: 用 PBS 处理作为空白对照组; (2) 氯喹组: 20 μg/mL 氯喹处理; (3) LPS 处理组: 100 ng/mL LPS 处理; (4) 氯喹加 LPS 组: 20 μg/mL 氯喹预处理 1 h, 再加 100 ng/mL LPS 共同处理; 各组细胞在不同处理因素下作用 24 h。

1.2.2 样品总蛋白提取与定量 Trizol 蛋白抽提试剂盒(Pierce Biotechnology)抽提待检样品总蛋白, 采用 BCA 蛋白质定量试剂盒, 根据厂家提供的操作说明进行总蛋白纯化定量。

1.2.3 细胞因子检测 应用 RayBio 小鼠炎症细胞因子抗体芯片进行检测, 主要步骤: (1) 封闭和孵育将含有 40 个主要炎症细胞因子的抗体芯片放入试剂盒提供的反应盒中, 在每孔内加入 100 μL 1×封闭液, 室温孵育 30 min 封闭玻片。去除封闭缓冲液, 分别在芯片 VI、VII、VIII 中加入相应的样品 50 μg, 在室温下孵育 1~2 h; 去除过量的样品溶液, 用不同的洗膜液分别洗玻片共 5 次; 将稀释后的生物素标记抗体加入相应孔内, 每孔 50 μL。室温孵育 2 h。重复洗膜 5 次; 在每个芯片中加入 50 μL 稀释了 1 500 倍的 Alexa-Fluor 555 标记的链霉亲和素, 室温孵育 2 h; 重复洗 5 次。(2) 荧光检测: 用洗液 II 温和清洗整张玻片, 加入足够的洗液 II 覆盖整张玻片, 室温下温和振荡 10 min。玻片在空气静置直至完全干燥, 使用激光扫描仪 Genpix4000B 扫描芯片, 进行数据分析。

1.2.4 标准化和比较 将芯片膜上各点测得的原始灰度值除以芯片中的 6 个阳性对照点平均值, 得出标准化后的灰度值, 片间及组间比较, 得出表达升高或降低倍数, 将比值小于 0.77 或大于 1.3 者选中并进行分析。

2 结果

LPS 刺激的 RAW264.7 炎症细胞因子抗体芯片检测。RayBio 小鼠炎症细胞因子抗体芯片膜可以同步检测 40 个主要的炎症相关细胞因子, 芯片膜上每个细胞因子均有 2 个位点(表 1)。空白组与氯喹处理组, 炎症细胞因子的分泌无明显变

表 1 芯片膜上细胞因子名称和位置列表

位置	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	POS	POS	POS	NEG	NEG	BLC	CD30L	Eotaxin	Eotaxin-2	Fas Ligand	Fractalkine	GCSF
2	POS	POS	POS	NEG	NEG	BLC	CD30L	Eotaxin	Eotaxin-2	Fas Ligand	Fractalkine	GCSF
3	GM-CSF	IFN γ	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12p40p70	IL-12p70
4	GM-CSF	IFN γ	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12p40p70	IL-12p70
5	IL-13	IL-17	I-TAC	KC	Leptin	LIX	Lymphotactin	MCP-1	MCSF	MIG	MIP-1 α	MIP-1 γ
6	IL-13	IL-17	I-TAC	KC	Leptin	LIX	Lymphotactin	MCP-1	MCSF	MIG	MIP-1 α	MIP-1 γ
7	RANTES	SDF-1	TCA-3	TECK	TIMP-1	TIMP-2	TNF- α	sTNF R I	sTNF R II	Blank	Blank	Blank
8	RANTES	SDF-1	TCA-3	TECK	TIMP-1	TIMP-2	TNF- α	sTNF R I	sTNF R II	Blank	Blank	Blank

化,均呈现低表达;LPS 刺激正常细胞 RAW264.7,细胞上清中炎症细胞因子呈高表达。应用氯喹处理的细胞,在经 LPS 刺激后炎症介质总体分泌下降。抗体芯片检测结果见图 1 和表 2。

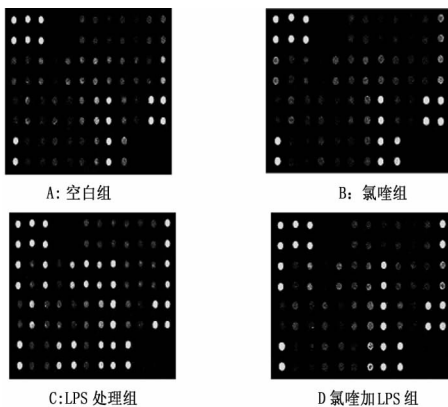


图 1 抗体芯片检测结果

表 2 氯喹处理 RAW264.7 细胞因子的表达变化

细胞因子	(氯喹加 LPS)/LPS	细胞因子	(氯喹加 LPS)/LPS
促炎因子		sTNF R I	0.544 156
IL-1 α	0.478 211	sTNF R II	0.578 551
IL-1 β	0.266 003	趋化因子	
TNF- α	0.331 213	RANTES	0.732 301
Fas Ligand	0.287 965	Lymphotactin	0.717 062
IL-6	0.102 897	MIG	0.526 765
IL-12p70	0.542 509	Eotaxin	0.492 78
IL-17	0.351 521	MIP-1 γ	0.766 219
IFN- γ	0.723 872	MCP-1	0.569 134
Leptin	0.482 406	I-TAC	0.462 589
抗炎因子		TCA-3	0.32 552
IL-2	0.471 984	SDF-1	0.295 054
IL-3	0.204 208	TECK	0.245 598
IL-4	0.438 414	TIMP-1	0.035 53
IL-10	0.709 639	TIMP-2	0.611 048
IL-13	0.360 17		

3 讨论

抗体芯片是一种检测生物样品中蛋白表达模式的方法,其具有高通量、平行性、高度特异性等优点^[5-6]。因此,在细胞因子研究领域得到广泛应用。研究表明,LPS 活化单核-吞噬细胞,通过一系列的细胞内信号转导,引起炎症介质的释放,介导脓毒症的发生^[7-8]。氯喹是一种 4-氨基喹啉类衍生物,非离子化的氯喹能够自由地出入生物膜,进入内体后即被双质子化不能跨越膜系统,从而影响内体中的酸性环境,抑制内体的成熟过程^[9]。前期研究显示,氯喹对 LPS 预处理的人外周血单个核细胞(hPBMC)和小鼠 RAW264.7 细胞释放 TNF- α 和 IL-6 的能力具有显著的抑制作用,并且氯喹对致死剂量 LPS 攻击的小鼠具有显著的保护作用^[10-12]。本研究显示,正常细胞与应用氯喹预处理的细胞在未经 LPS 刺激前,各种炎症介质分泌水平均较低;经 LPS 刺激后,正常细胞炎症介质总体分泌水平显著上调,而在应用氯喹预处理的细胞经 LPS 刺激后,抗炎细胞因子 IL-2、IL-3、IL-4、IL-10、IL-13 等,促炎细胞因子 IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-12p70、IL-17、IFN- γ 等以及趋化因子 RANTES、Lymphotactin、MIG、Eotaxin、MIP-1 γ 等的分泌均显著下调。上述研究结果提示氯喹对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子分泌均具有抑制作用,其机制可能与其抑制巨噬细胞内体的酸化成熟有关。

Toll 样受体家族(Toll-like receptors, TLRs)是单核-吞噬细胞系统识别细菌病原分子的主要模式识别受体,其中 TLR4 是 LPS 的模式识别受体^[13],进入机体后,与血中内毒素结合蛋白(LPS-binding protein, LBP)结合,LBP 将 LPS 转递给受体 CD14 形成 LPS-CD14 复合物,并以此复合物形式与细胞膜上的 TLR4 跨膜受体结合,通过跨膜信号转导,活化单核/巨噬细胞;此外,LPS-TLR4 复合物通过网格蛋白依赖的内化途径内化入胞启动胞内信号转导,活化单核/巨噬细胞^[14-15]。应用氯喹后致使内体酸化成熟障碍,使 LPS-TLR4 复合物在内体中屯积,抑制了 TLR4 的胞内再循环过程,导致 TLR4 的回膜障碍。由于细胞膜上 TLR4 分布减少,细胞外配体不能与其结合介导胞膜和胞内的信号转导通路,从而影响巨噬细胞的活化,但氯喹抑制巨噬细胞活化的具体机制还有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] Xin L, Juan C, Xin CZ, et al. Targeting CpG DNA to screen and isolate anti-sepsis fraction and monomers from traditional Chinses herbs using affinity biosensor technology[J]. International Immunopharmacology, 2009, 9: (下转第 219 页)

- bined intrarenal surgery in Galdakao-modified supine Valdivia position; a new standard for percutaneous nephrolithotomy [J]. *Eur Urol*, 2008, 54(11): 1393-1403.
- [4] Clayman RV. Supine position is safe and effective for percutaneous nephrolithotomy[J]. *J Urol*, 2005, 174(2): 601-602.
- [5] Jadad AR, Moore RA, Carroll D, et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: Is blinding necessary [J]. *Control Clin Trials*, 1996, 17(1): 1-12.
- [6] 刘建平. 非随机研究的系统评价方法(一)[J]. *中国循证医学*, 2001, 1(4): 239-243.
- [7] Falahatkar S, Asgari SA, Nasseh A, et al. Kidney displacement in complete supine PCNL is lower than prone PCNL [M]. *Urol Res*, 2010, DOI: 1007/s00240-010-0314-1. (published online: 12 October 2010).
- [8] Sio DM, Autorino R, Quarto G, et al. Modified supine versus prone position in percutaneous nephrolithotomy for renal stones treatable with a single percutaneous access: a prospective randomized trial[J]. *Eur Urol*, 2008, 54(2): 196-202.
- [9] Falahatkar S, Moghaddam AA, Salehi M, et al. Complete supine percutaneous nephrolithotripsy comparison with the prone standard technique [J]. *J Endourol*, 2008, 22(21): 2513-2517.
- [10] Shoma AM, Eraky I, El-Kenawy MR, et al. Percutaneous nephrolithotomy in the supine position; technical aspects and functional outcome compared with the prone technique[J]. *Urology*, 2002, 60(3): 388-392.
- [11] Amon Sesmero JH, Del Valle Gonzalez N, Conde Redondo C, et al. Comparison between Valdivia position and prone position in percutaneous nephrolithotomy[J]. *Actas Urol Esp*, 2008, 32(3): 424-429.
- [12] Valdivia Uria JG, Lanchares E, Villaroya S, et al. Percutaneous nephrolithotomy; simplified technic (preliminary report) [J]. *Arch Esp Urol*, 1987, 40(2): 177-180.
- [13] Rodrigues Netto N, Lemos GC, Fiuza JL. Colon perforation following percutaneous nephrolithotomy [J]. *Urology*, 1988, 32(2): 223-224.
- [14] Boon JM, Shinnors B, Meiring JH. Variations of the position of the colon as applied to percutaneous nephrostomy [J]. *Surg Radiol Anat*, 2001, 23(3): 421-425.
- [15] Tuttle DN, Yeh BN, Meng MV, et al. Risk of injury to adjacent organs with lower-pole fluoroscopically guided percutaneous nephrostomy evaluation with supine, prone and multiplanar reformatted CT [J]. *Interv Radiol*, 2005, 16(7): 1489-1492.

(收稿日期: 2011-07-09 修回日期: 2011-09-22)

(上接第 215 页)

1021-1031.

- [2] Krawczyk-Michalak K, Glapiński A, Brzezińska-Błaszczyk E. Toll-like receptors and their role in regulation of the inflammatory response in sepsis [J]. *Anestezjol Intens Ter*, 2008, 40(4): 253-259.
- [3] Niels C, Ren-Feng G, Peter A, et al. Novel strategies for the treatment of sepsis [J]. *Nature medicine*, 2003, 9(5): 517-524.
- [4] 付建峰, 何新建. 脓毒症的发病机制及防治药物研发新思路 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(1): 66-68.
- [5] 刘英, 彭瑞云, 李杨. 抗体芯片的应用进展 [J]. *现代免疫学*, 2006, 26(3): 251-254.
- [6] 陈玉, 孙红, 刘火旺, 等. 抗体芯片分析炎症细胞因子在复发性鼻息肉中的表达 [J]. *中南大学学报*, 2009, 34(11): 1086-1090.
- [7] Holub M. Sepsis; infection and systemic inflammatory response [J]. *Cas Lek Cesk*, 2007, 146(2): 109-114.
- [8] Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, et al. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity [J]. *Immunobiology*, 1993, 187(3): 169-190.
- [9] Weber SM, Levitz SM. Chloroquine antagonizes the proinflammatory cytokine response to opportunistic fungi by alkalinizing the fungal phagolysosome [J]. *J Infect Dis*, 2001, 183: 935-942.
- [10] Hong Z, Jiang Z, Liangxi W, et al. Chloroquine protects mice from challenge with CpG ODN and LPS by decreasing proinflammatory cytokine release [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4: 223-226.
- [11] 丁国富, 王良喜, 周红, 等. 氯喹抑制 LPS 和 CpG DNA 诱导人外周血单个核细胞释放促炎细胞因子的研究 [J]. *山东医药*, 2004, 44(1): 9-11.
- [12] 王艳艳, 郑江. 氯喹对脂多糖/内毒素诱导的 RAW264.7 细胞 TLR4-MyD88 非依赖信号转导途径的抑制作用 [J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(9): 869-873.
- [13] Vianna RC, Gomes RN, Bozza FA, et al. Antibiotic treatment in a murine model of sepsis; impact on cytokines and endotoxin release [J]. *Shock*, 2004, 21(2): 115-120.
- [14] Kagan JC, Su T, Horng T, et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(3): 361-368.
- [15] 王艳艳, 郑江. LPS-TLR4 复合物内化障碍与 LPS 介导巨噬细胞活化的实验研究 [J]. *重庆医学*, 2011, 40(23): 2291-2296.

(收稿日期: 2011-08-12 修回日期: 2011-11-18)