



读书报告

朱振祥

2017.8.19

Original Paper

GLP-2 Suppresses LPS-Induced Inflammation in Macrophages by Inhibiting ERK Phosphorylation and NF- κ B 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

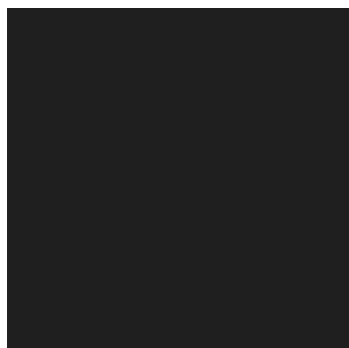
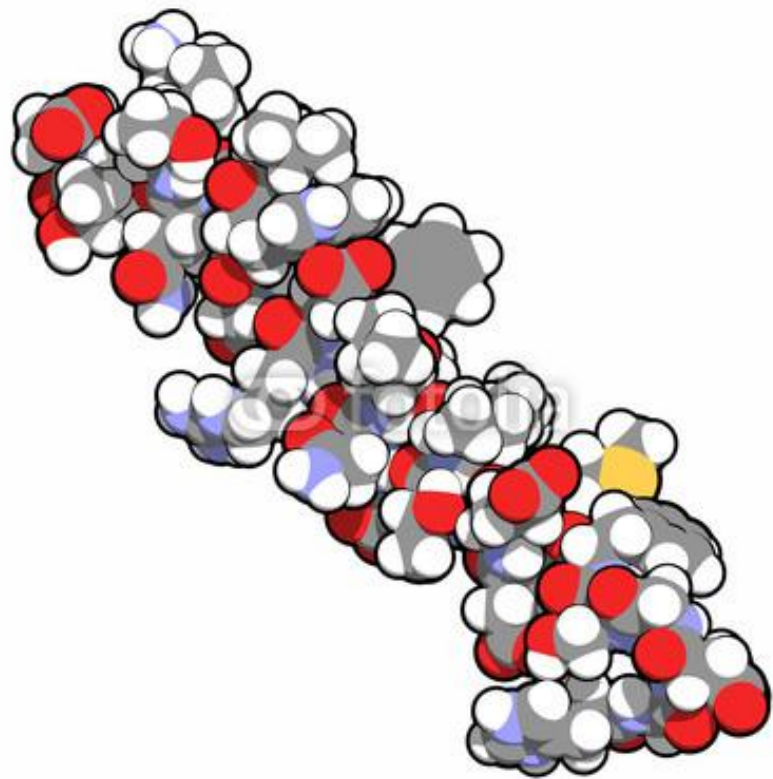
Content

01 背景介绍

02 材料与方法

03 结果

04 讨论分析



背景介绍

Background

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。

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。

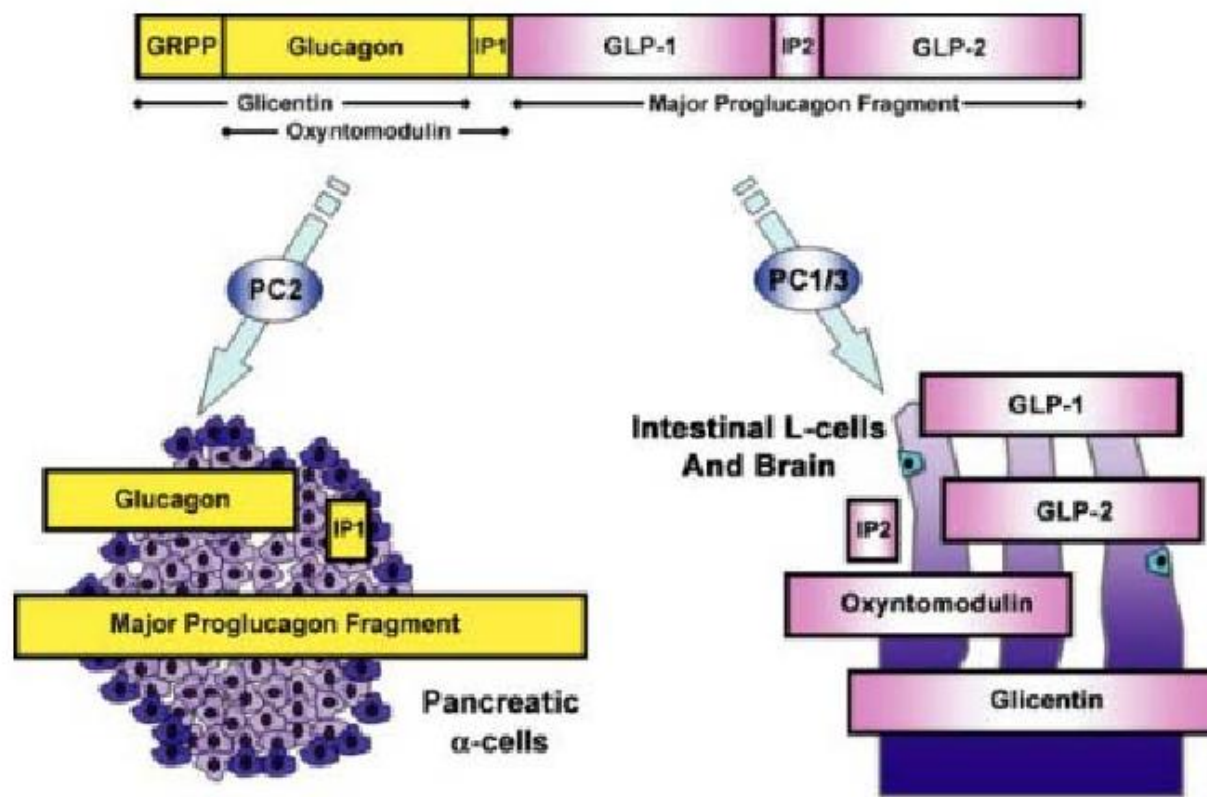
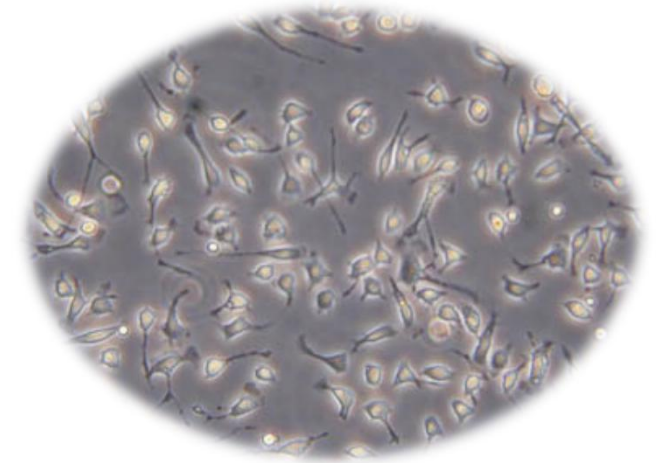


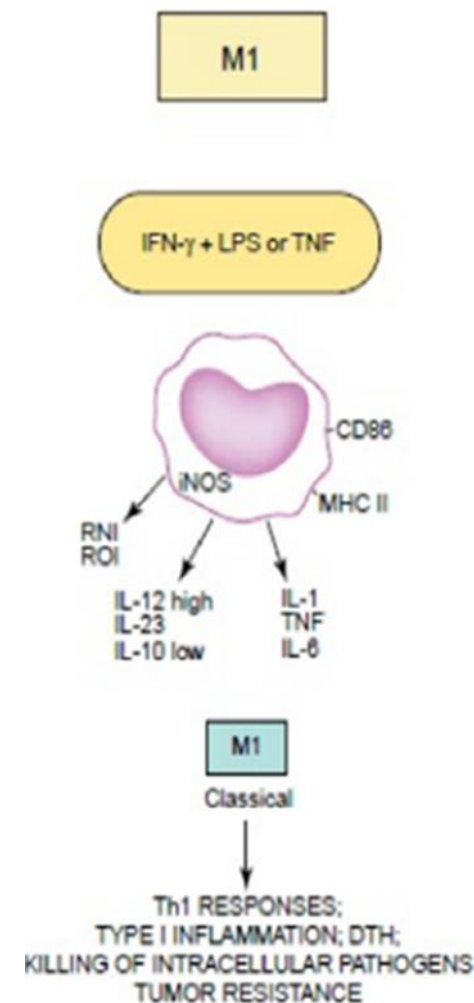
图 1.1.1 高血糖素由 PC2 和 PC1/3 组织特异性处理形式^[6]

巨噬细胞是先天免疫的重要组成部分，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。

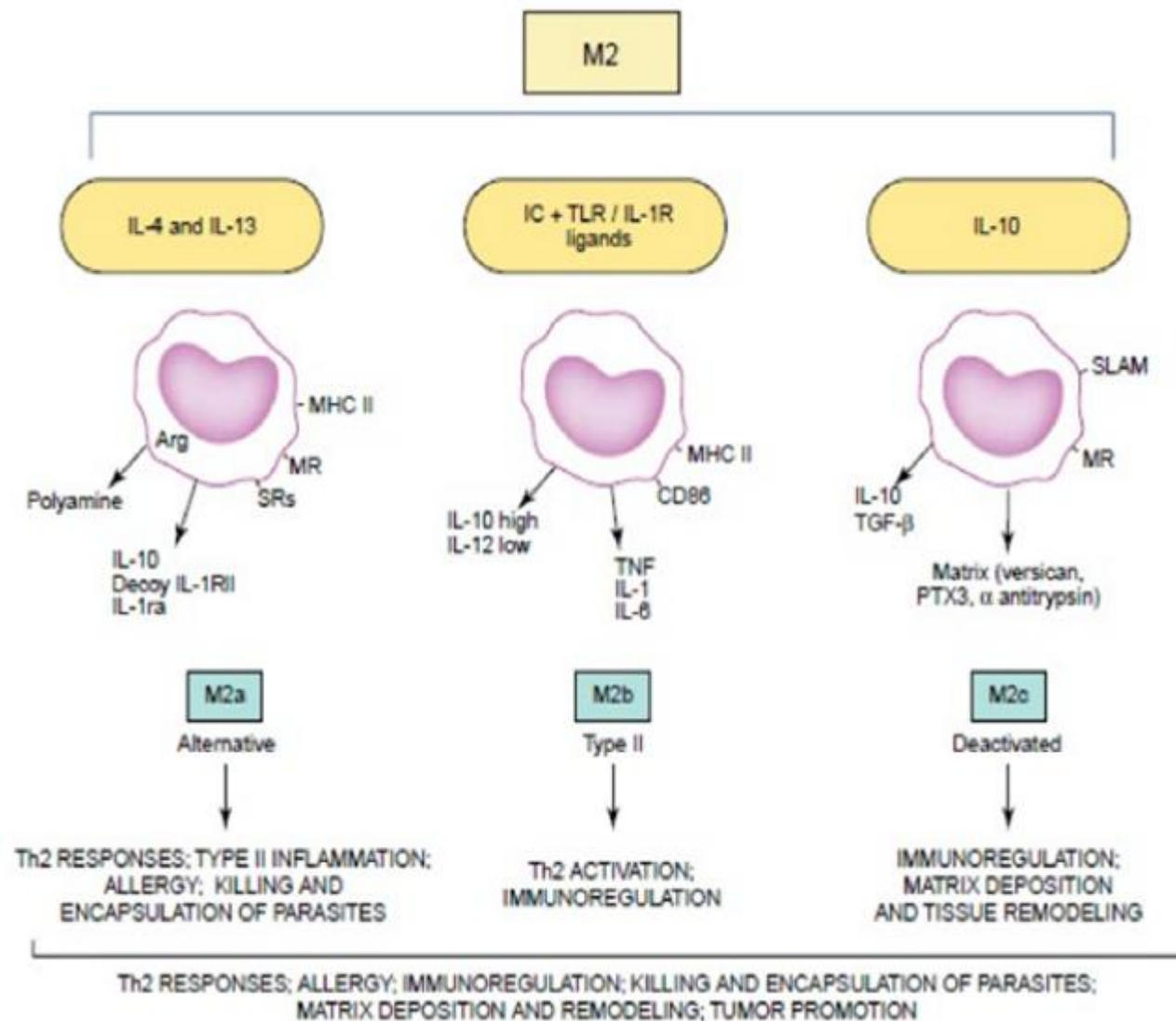


背景介绍

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）。



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。

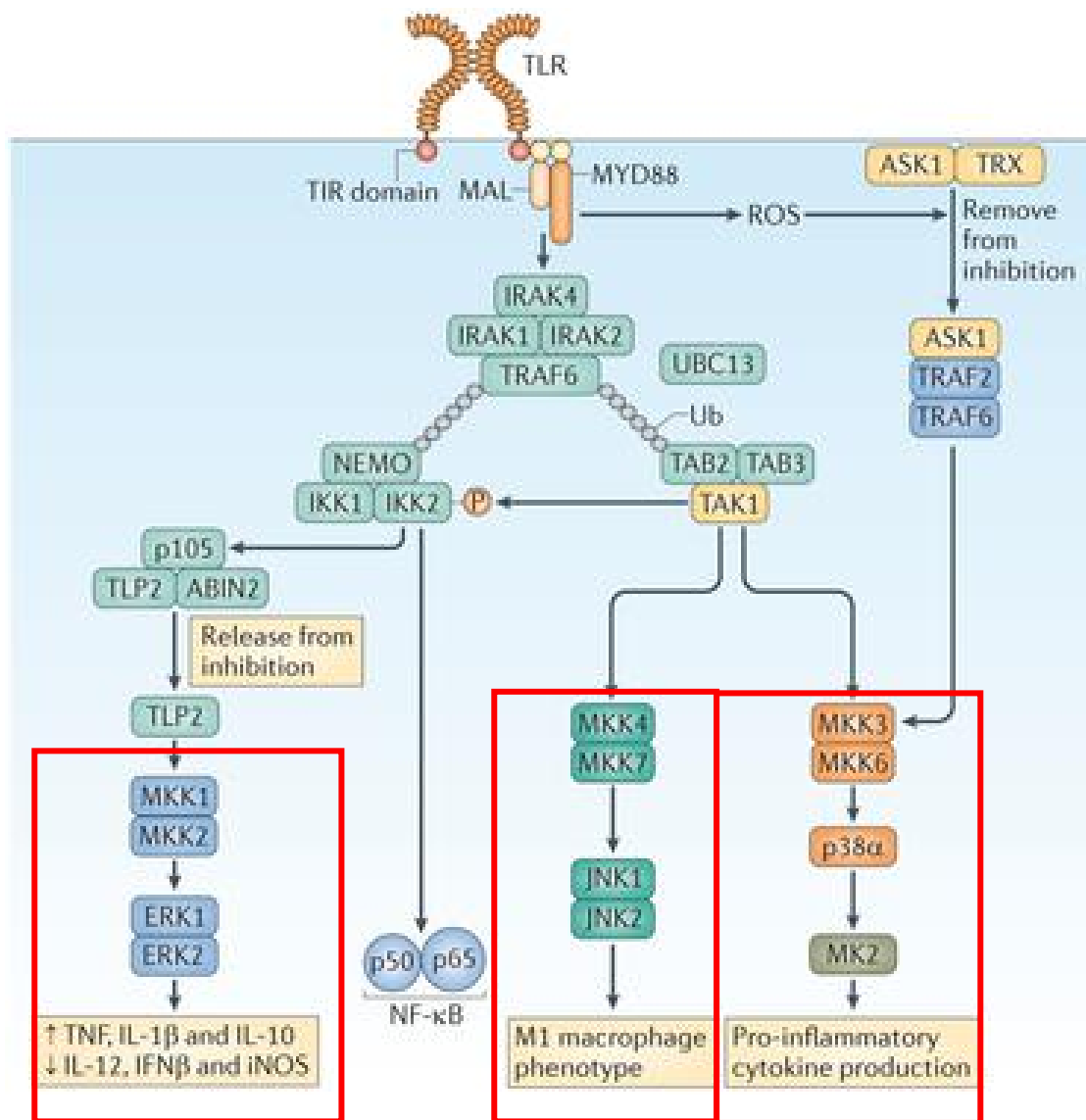


LPS 为革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分，与 LBP、CD14 结合形成 LPS-LBP-CD14 三联复合物作用于巨噬细胞表面的 TLR4，从而活化 **MAPKs** 和 **NF- κ B** 两条信号通路，诱导相关靶基因的转录，释放 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 等促炎细胞因子。



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。

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。



NF- κ B 家族包括 Rel A (p65)、c-Rel、Rel B、NF- κ B₁ (p50 及其前体 p105) 和 NF- κ B₂ (p52 及其前体 p100) 五个成员。细胞处于静止状态时，NF- κ B 二聚体与其抑制因子 I κ B- 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，I κ B 激酶 (IKK) 被激活，在 I κ B 激酶催化下，I κ B 发生磷酸化，泛素化，最后被蛋白酶降解，并与 NF- κ B 分离。活化的 NF- κ B 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- κ B 快速诱导 Nfk B1a 基因的转录，从而编码 I κ B- α 的基因的转录。新合成的 I κ B- α 进入细胞核，使 NF- κ B 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amp;方法

Material and method

材料与amp;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



Q-PCR 分析



细胞活性分析



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°C，5%CO₂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 $20\mu\text{L}$ MTT 溶液 ($5\text{mg}/\text{mL}$)， 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ 培养 4h，终止培养，小心吸去孔内培养液，每孔加入 $100\mu\text{L}$ DMSO 溶解紫色结晶物，在酶标仪 570nm 波长处测量各孔的吸光值。

Q-PCR测定:

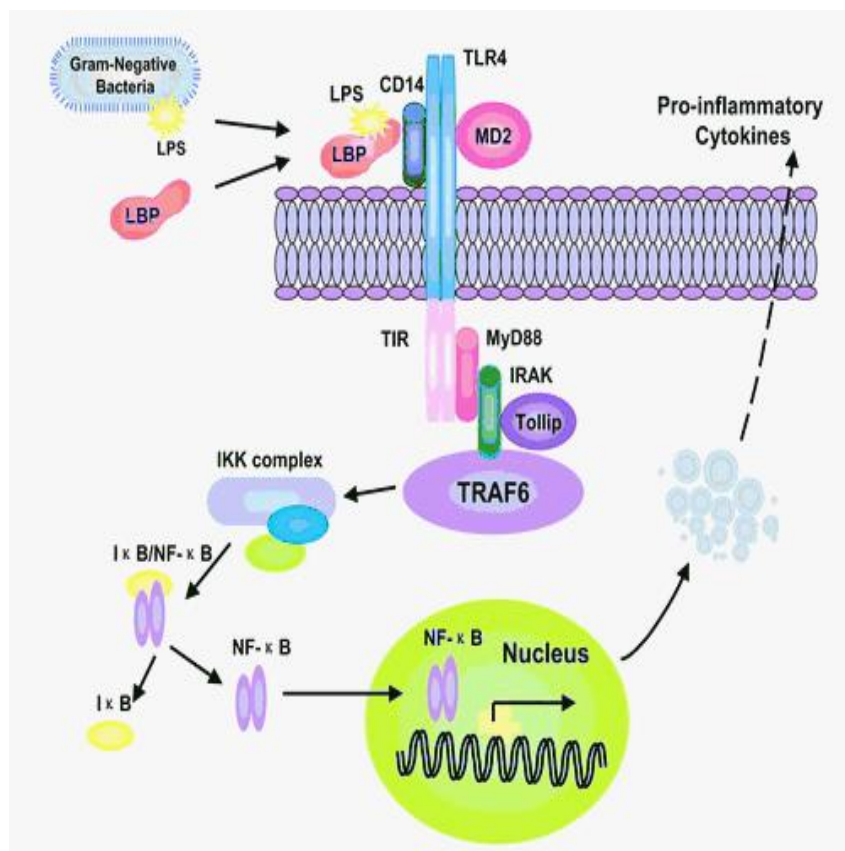
Table 1. The primer sequences of β -actin, GLP-2R, iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β and IL-6

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

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°C，13000g 离心 3min。弃 PBS，加入 70 μ L 含蛋白酶抑制剂（现用现加）的蛋白裂解液，吹打混匀，4°C 裂解 30min。4°C 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°C 保存，避免反复冻融。



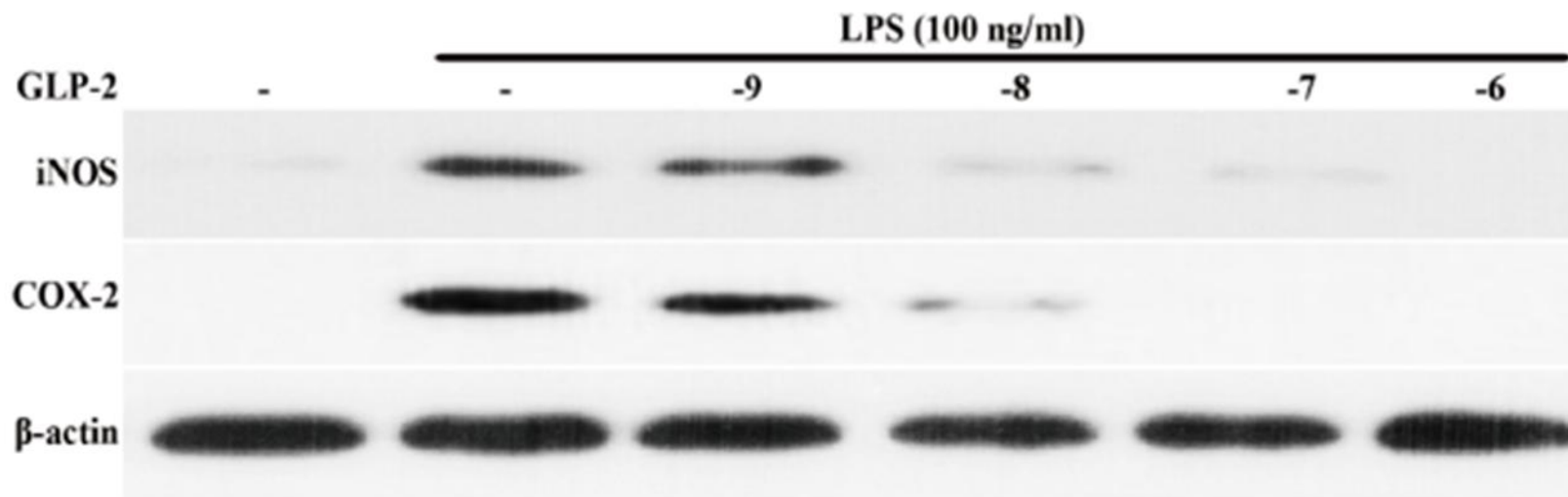
結果

Results

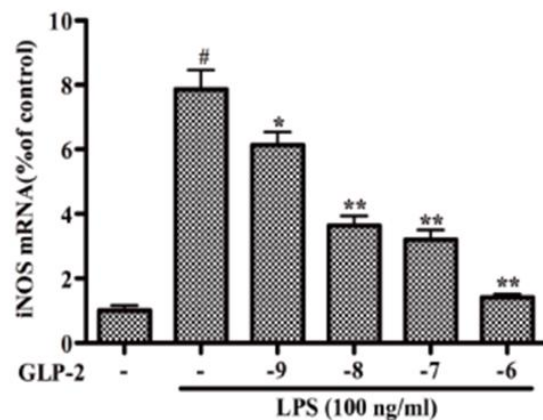
结果

iNOS 和 COX-2 等促炎酶的蛋白质和mRNA的表达

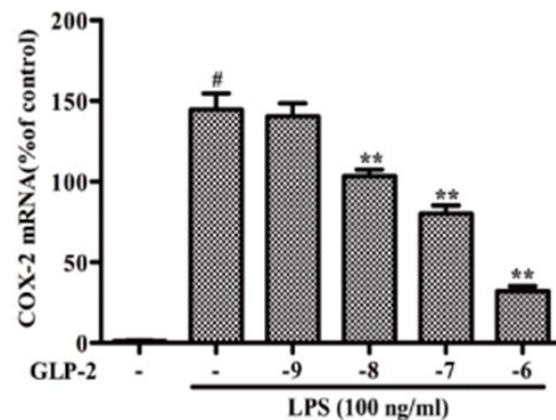
(C)



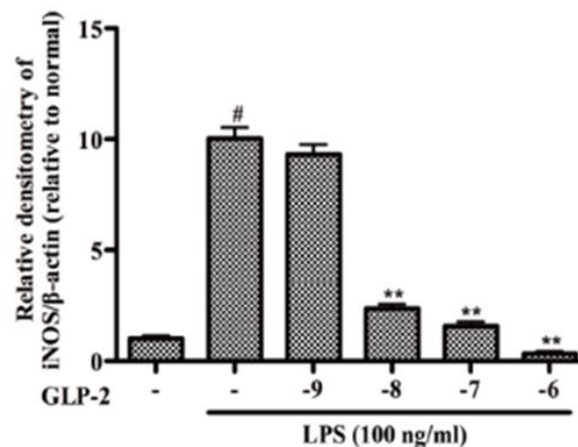
(A)



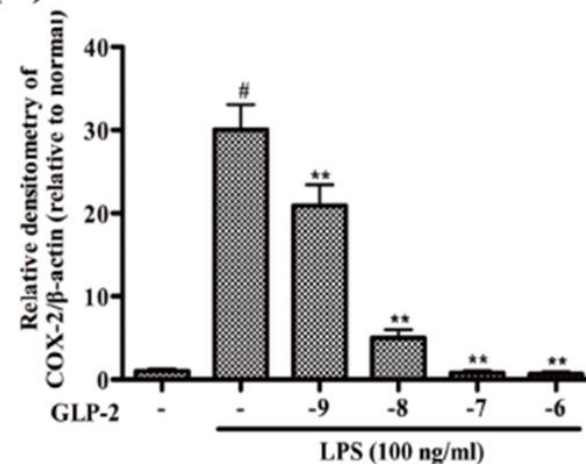
(B)



(D)

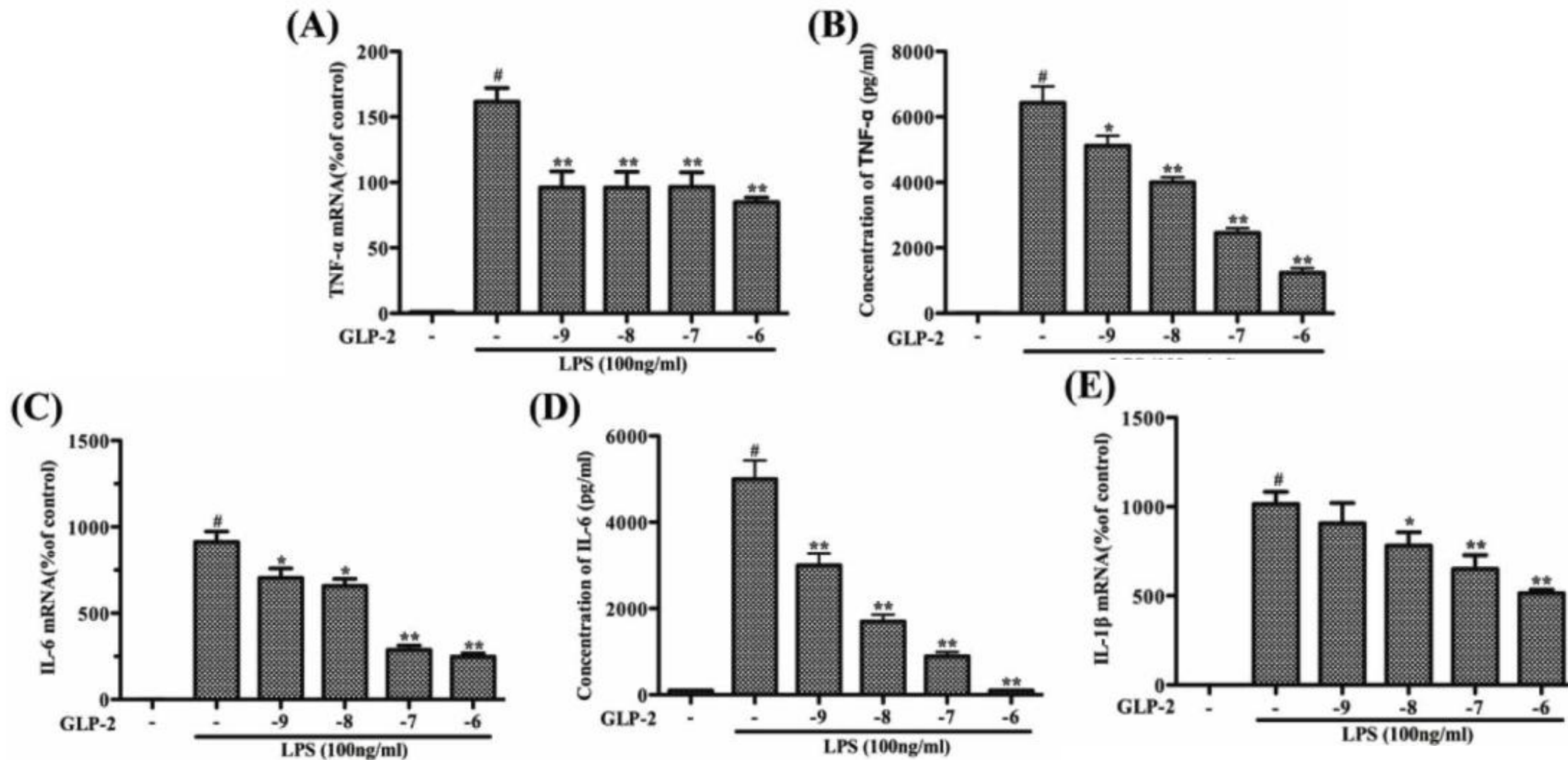


(E)



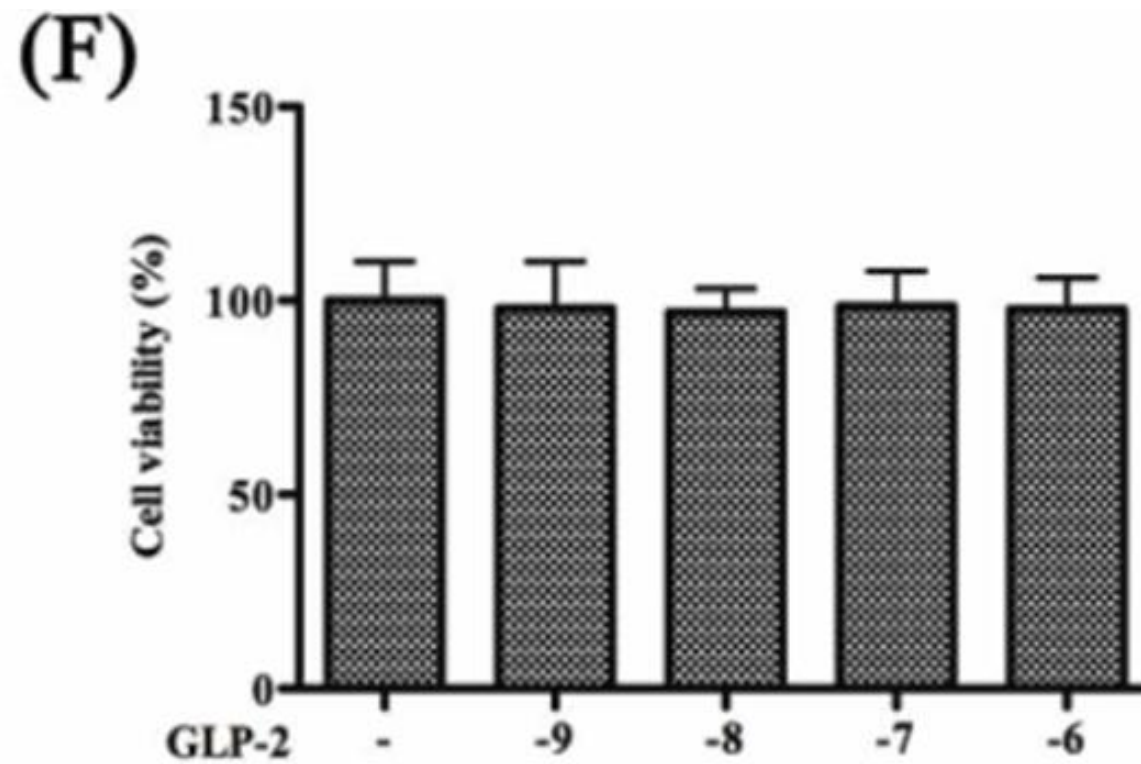
结果

TNF- α , IL-1 β 和 IL-6蛋白质和mRNA的表达



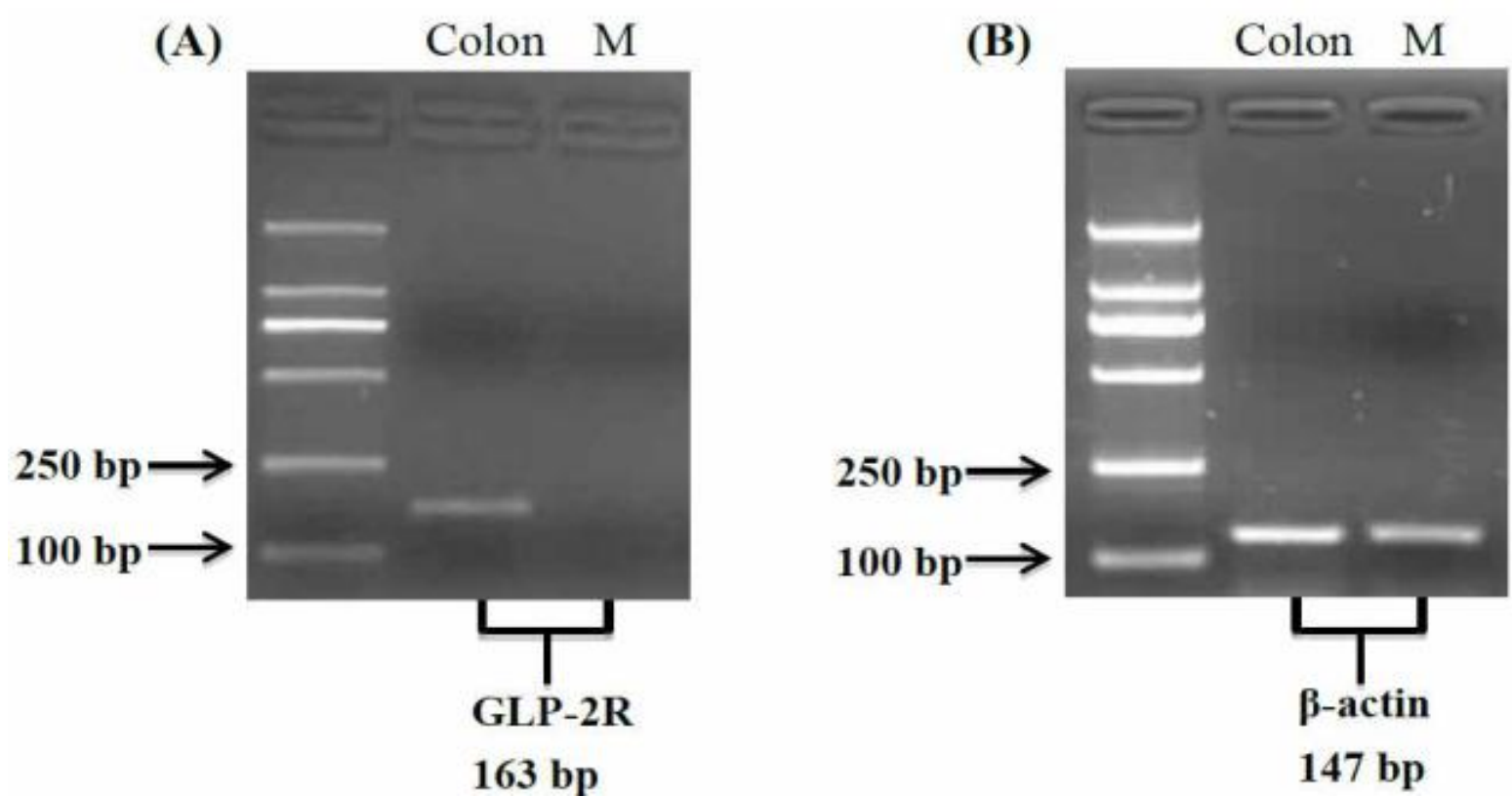
结果

巨噬细胞细胞活力的检测（MTT 法）



结果

巨噬细胞GLP-2R的检测

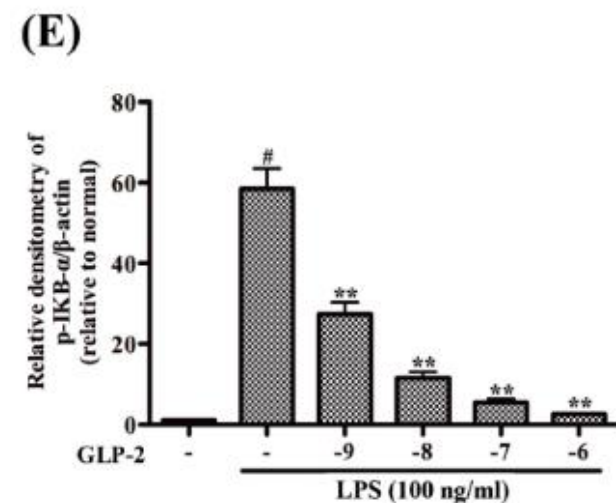
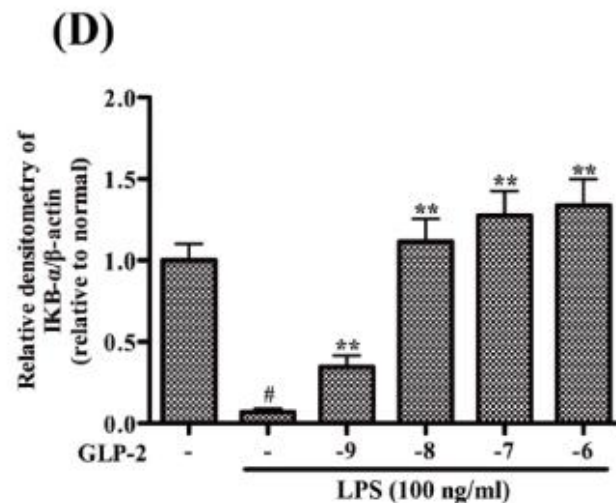
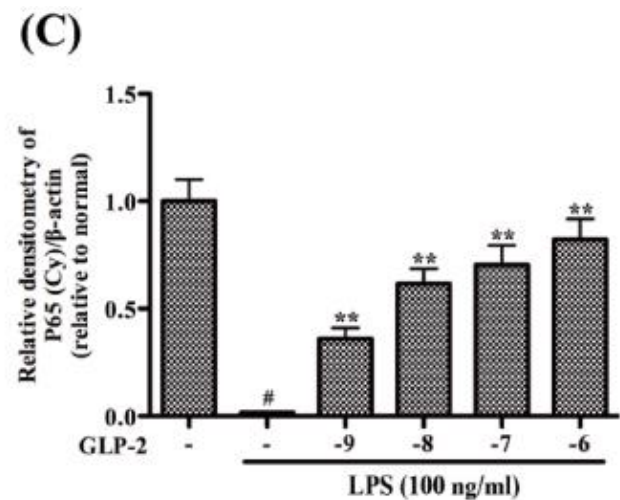
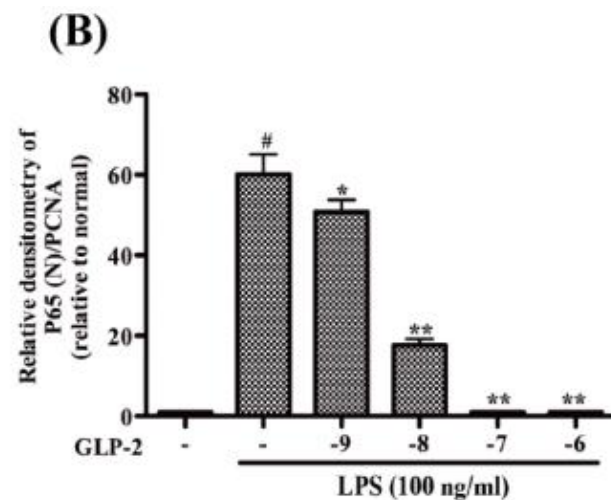
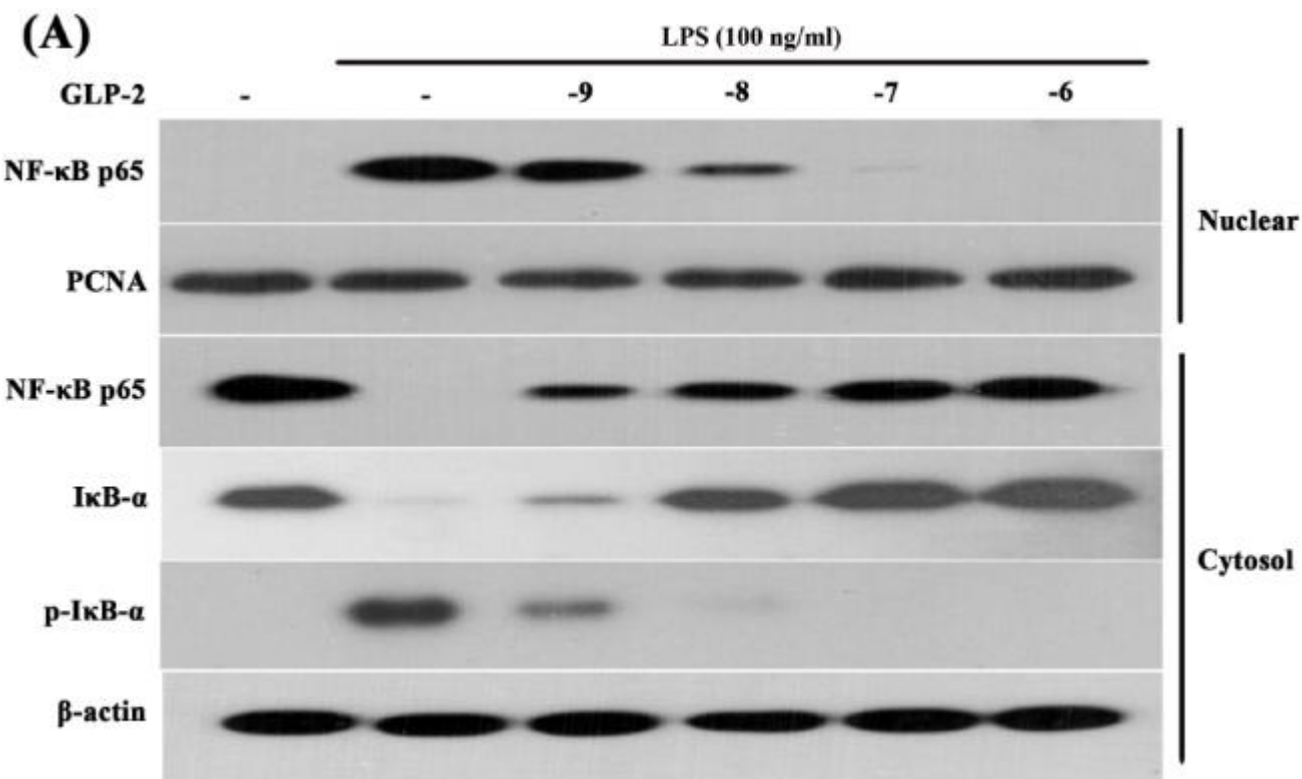


巨噬细胞

肠道

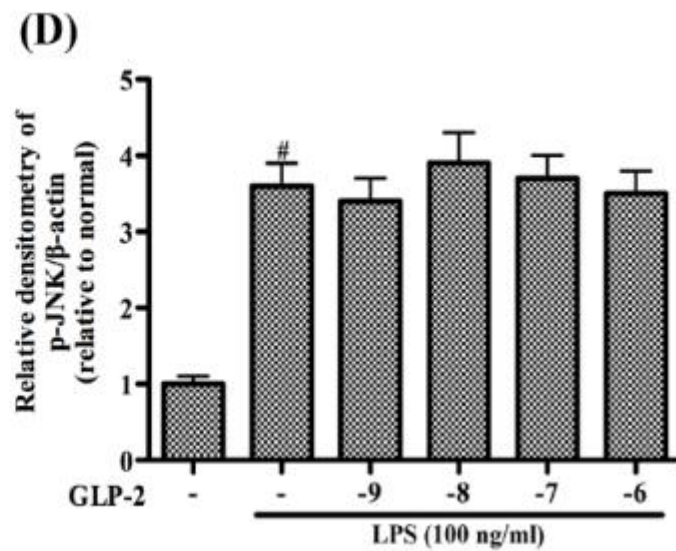
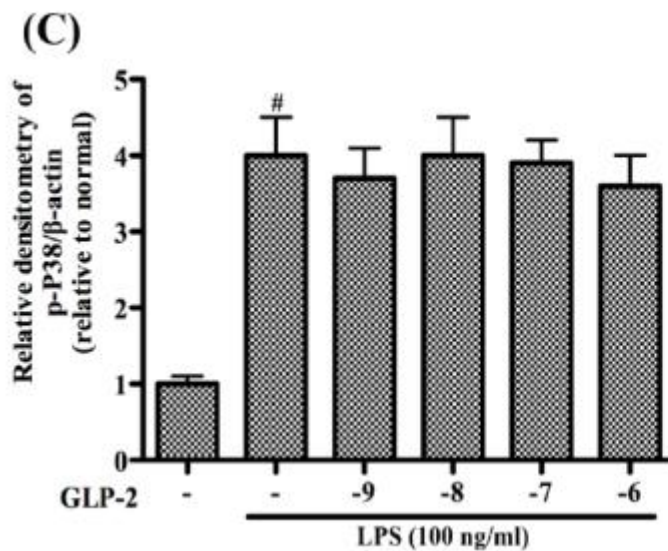
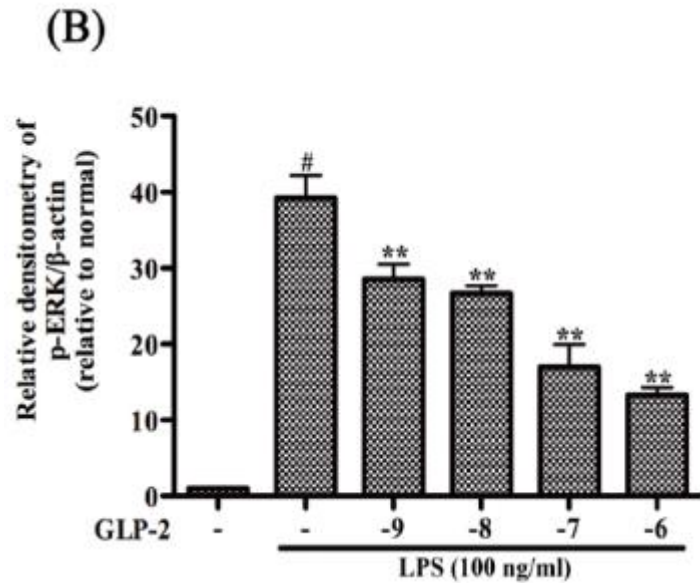
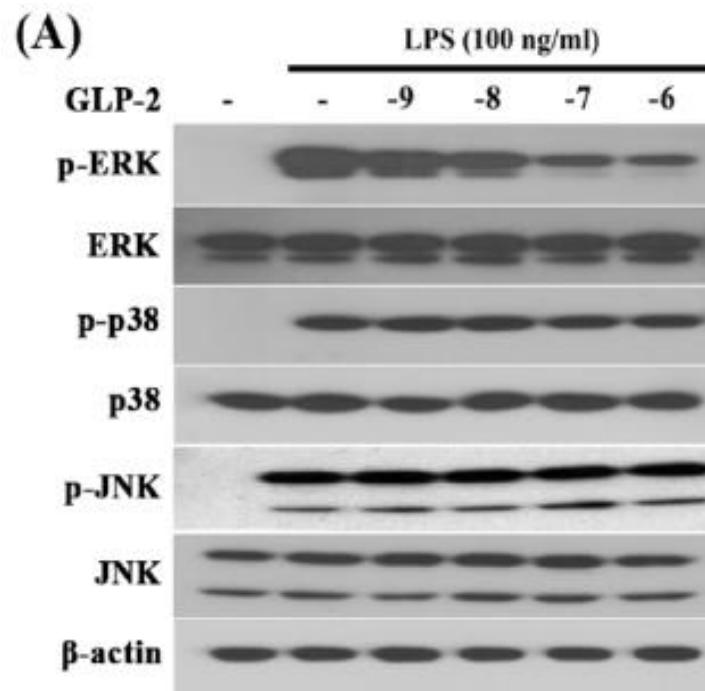
结果

NF- κ B、I κ B- α 的表达



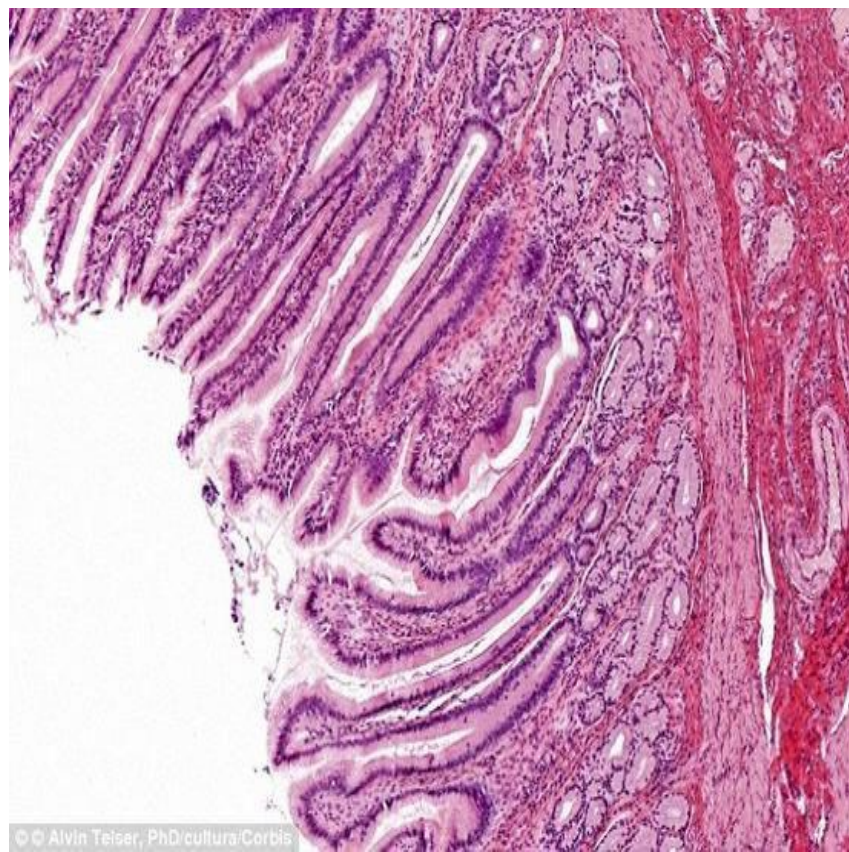
结果

ERK 的表达量



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-1 β 、TNF- α 和 IL-6）mRNA 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 I κ B- α 的磷酸化和 NF- κ B 的核转位。



© Alvin Teiser, PhD/cultura/Corbis

讨论分析

Discussion

- 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**。

3. GLP-2 对 LPS 活化巨噬细胞中 I κ B- α 蛋白磷酸化和 NF- κ B 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- κ B 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 mRNA 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-1 β 、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-1 β 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！