

对细胞的毒性作用可能是由于 SeO_3^{2-} 与细胞膜的作用破坏了细胞膜的结构和 Ca^{2+} 的调控机制, 最后导致细胞崩解死亡。

参 考 文 献

- 1 Shamberger R J. In: Friden E ed. Biochemistry of selenium. New York and London: Plenum Press, 1983: 31
- 2 Gabor S, Ciugudeanu M, Surcel D. Environ Res, 1985; 37: 293
- 3 Fisher G L, McNeill K L, Democko C J. Environ Res, 1986; 39: 164
- 4 Ling J, Wen H R, Chen R S *et al.* In: Anastassopoulou J eds. Metal ions in biology and medicine. Paris: John Libbey Eurotext, 1992; 2: 295
- 5 Colvin R A, Ashavaia T F, Herbert L G. Biochem Biophys Act, 1985; 821: 601
- 6 Gryniewicz G, Poenie M, Tsien R Y. J Biol Chem, 1985; 260: 3440
- 7 McDonough P M, Button D C. Cell Calcium, 1989; 10: 171
- 8 Murphy E, Freudenrich C C, Levy L A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 2981
- 9 Raju B, Murphy E, Levy L A *et al.* Am J Physiol, 1989; 256: C540
- 10 Holker K J, Speakman J B. J Appl Chem, 1958; 8: 1
- 11 Jenkins K J, Hidioglou M. Can J Biochem, 1971; 49: 468
- 12 温和瑞, 王金唏, 陈荣三等. 无机化学学报, 1993; 9 (3): 266

13 Nayler W G. European Heart J, 1983; 4 (suppl. c): 33

14 张祖喧, 陈荣三. 科学通报, 1979; 24: 471

Effects of Sodium Selenite on Cytoplasmic Free Ca^{2+} and Mg^{2+} of Alveolar Macrophages.

Wen Herui, Wang Jinxi, Zhu Weihua, Li Ruiyan, Chen Rongsan (Coordination Chemistry Institute, State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093, China).

Abstract Cytoplasmic free Ca^{2+} and Mg^{2+} concentration ($c(\text{Ca}^{2+})_i$ and $c(\text{Mg}^{2+})_i$) of alveolar macrophages in rabbit lung after incubation with sodium selenite were determined by SPEX AR-CM-MIC system. The results showed that high concentration sodium selenite ($\geq 10^{-4}$ mol/L) had the cytotoxicity. The poisonous effect of selenite on macrophage led to the increase of $c(\text{Ca}^{2+})_i$ and $c(\text{Mg}^{2+})_i$. High concentration selenite had some suppressive effect on the Ca^{2+} -ATPase activity of erythrocyte membrane.

Key words sodium selenite, cytotoxicity, cytoplasmic free Ca^{2+} , cytoplasmic free Mg^{2+} , Ca^{2+} -ATPase

反义 c-fos 和 c-jun 抑制 IL-1 诱导阿片肽分泌*

王朝晖 单巍松 吴希如

(北京医科大学第一临床医学院, 北京 100034)

摘要 白细胞介素-1 (IL-1) 及阿片肽作为神经调质参与了神经细胞兴奋性毒性作用. 以大鼠大脑皮层神经细胞为研究对象, 探讨了 IL-1、阿片肽和 c-fos、c-jun 表达产物之间的关系. 结果表明, IL-1 β 能诱导大脑皮层神经细胞 c-fos、c-jun mRNA 瞬时短暂表达, 15 min 增高, 30 min 达高峰, c-fos mRNA 2 h 回至基线水平, c-jun mRNA 8 h 回至基线水平; 联合应用 c-fos、c-jun 反义寡核苷酸能部分抑制 IL-1 诱导的大脑皮层神经细胞脑啡肽及 β -内啡肽分泌增加, 呈一定量效关系, 相应意义寡核苷酸无抑制作用. 提示 IL-1 促进大脑皮层神经细胞脑啡肽及 β -内啡肽分泌作用部分受 Fos 和 Jun 蛋白调控.

关键词 大脑皮层神经细胞, 白细胞介素-1, 阿片肽, c-fos, c-jun, 反义寡核苷酸

白细胞介素-1 (IL-1) 及阿片肽参与了免疫系统和内分泌系统之间的双向调控作用; 它们作为神经调质, 与神经细胞的多种功能活动、神经细胞可塑性及兴奋性改变密切相关^[1,2]. 已有证据表明, IL-1 和阿片肽中的脑啡肽及 β -内啡肽可使神经细胞兴奋性增高, 加剧神经细胞的兴奋性毒性作用^[2~4]. IL-1 和脑啡肽及 β -内啡肽之间又存在联系, IL-1 在脑内的作用与阿片肽及其他神经递质或神经肽的释放或协同作用有关^[5]. IL-1 能促进垂体细胞 β -内啡肽分泌, 其作用受即刻早期基因 *c-fos*、*c-jun* 表达产物 Fos 和 Jun 蛋白所形成的异源二聚体调控^[6], Fos 和 Jun 为核内第三信使, 具有转录调节因子及转录因子作用, 惊厥动物模型脑组织中 *c-fos*、*c-jun* 及脑啡肽原 mRNA 表达的时相差异亦提示 *c-fos* 和 *c-jun* 促进了脑啡肽原 mRNA 表达^[7]. 我们在实验中亦发现 IL-1 明显促进大脑皮层神经细胞脑啡肽原 mRNA 表达及亮-脑啡肽 (LE) 增多, 对 β -内啡肽分泌有一定作用, IL-1 对神经细胞的兴奋性作用部分依赖于阿片肽的神经调节作用, IL-1 和阿片肽又均能诱导皮层细胞 *c-fos*、*c-jun* mRNA 表达 (资料待发表). 但 IL-1、*c-fos*、*c-jun* 及阿片肽之间的相互关系和具体作用方式尚不清楚. 为此, 我们采用 *c-fos*、*c-jun* 反义寡核苷酸阻断 Fos 及 Jun 蛋白表达后, 观察 IL-1 对大鼠大脑皮层神经细胞阿片肽分泌影响的变化.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物来源: 来自我校动物实验科学部, 采用 15 d 孕、体重 250~300 g 的 Wistar 孕鼠的胎鼠进行大脑皮层神经细胞培养.

1.1.2 质粒和菌株: 含 *c-fos* cDNA 质粒 pSP65 及 *c-jun* cDNA 质粒 pGEM4 由美国 Tom Curran 博士赠送, 菌株为大肠杆菌 DH5 α .

1.1.3 反义寡核苷酸合成: 在我校分子生物中心合成. *c-fos* 及 *c-jun* 反义寡核苷酸的设计选择核苷酸序列 5' 端紧邻翻译起始密码子 ATG

后的 18 个核苷酸^[6,8,9], 分别为 5' -CGC-GTT-GAA-ACC-CGA-GAA-3' 和 5' -CGT-TTC-CAT-CTT-TGC-AGT-3'; 其 *c-fos* 和 *c-jun* 意义寡核苷酸分别为: 5' -TTC-TCG-GGT-TTC-AAC-GCG-3' 和 5' -ACT-GCA-AAG-ATG-GAA-ACG-3'. 合成后经高压液相色谱仪过柱及乙醇纯化, 冷冻抽干备用.

1.1.4 试剂及药盒: IL-1 β 购自 Sigma 公司及军事医学科学院; IL-1 受体拮抗剂 (IL-1ra) 系北京医科大学免疫研究室马大龙教授惠赠; 限制性内切酶 EcoR I、Hind III 购自华美生物工程公司; [α -³²P] dCTP 购自美国杜邦公司; 随机引物 DNA 探针标记药盒购自 Promega 公司; LE 及 β -内啡肽放免测定药盒购自国防科工委航天医学研究所; MEM 培养液, 胎牛血清、胰蛋白胨、酵母粉及其他试剂分别购自 GIBICO、Sigma 公司及国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 大鼠胚胎大脑皮层神经细胞原代分离培养: 采用我室常规方法. 体外培养 12 d, 生长良好的神经细胞待用.

1.2.2 LE 及 β -内啡肽测定: 采用药盒所示放免测定法. 所有实验中 IL-1 β 作用剂量为 15 U/ml, 作用时间 20 h. LE 测定采用 IL-1 作用神经细胞后的培养上清液, β -内啡肽测定采用细胞匀浆液.

1.2.3 大脑皮层神经细胞总 RNA 提取: 采用异硫氰酸胍一步法提取.

1.2.4 探针制备及 RNA 印迹: 质粒在大肠杆菌中转化, 质粒 DNA 扩增及碱裂解法快速提取、DNA 片段酶切、低熔点凝胶 DNA 片段回收、随机引物法标 cDNA 探针; 以 30 μ g RNA 每样本, 在 1% 琼脂糖-2.2 mol/L 甲醛凝胶中电泳, 电压为 50 V, 电泳 6 h, 电泳后将 RNA 转移至尼龙膜上, 烤干. 42 $^{\circ}$ C, 将转有 RNA 的尼龙膜于预杂交液中预杂交 4~6 h, 然后与 ³²P 标记的 *c-fos* 或 *c-jun* 探针进行杂交 18~24 h, 最后于 0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS 中洗膜, -70 $^{\circ}$ C 放射自显影 48 h. 结果以我校的图象分析系统测定杂交带总 A 值.

2 结 果

2.1 IL-1 诱导大脑皮层神经细胞 c-fos、c-jun mRNA 表达

大鼠大脑皮层神经细胞经 IL-1 β 作用不同时间后, 图 1 和图 2 结果显示 c-fos 和 c-Jun mRNA 表达均在 15 min 开始增高, 30 min 达高峰, 1 h 开始下降, c-fos mRNA 2 h 基本回至正常基线水平, 而 c-jun mRNA 2 h 仍较正常对照高, 8 h 回至基线水平。

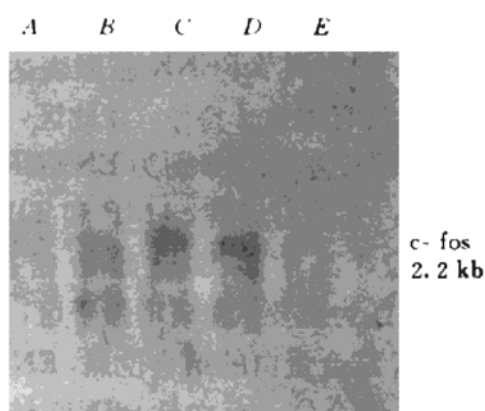


图 1 RNA 印迹 IL-1 诱导大脑皮层神经细胞 c-fos mRNA 表达时间效应

A、B、C、D、E 分别为 IL-1 作用大脑皮层神经细胞 0 min、15 min、30 min、1 h、2 h 后 c-fos mRNA 表达。

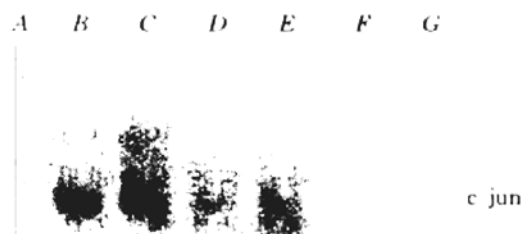


图 2 RNA 印迹 IL-1 诱导大脑皮层神经细胞 c-jun mRNA 表达的时间效应

A、B、C、D、E、F、G 分别为 IL-1 作用大脑皮层神经细胞 0 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h 后 c-jun mRNA 表达。

2.2 c-fos 和 c-jun 反义寡核苷酸抑制 IL-1 诱导大脑皮层神经细胞脑啡肽分泌

分别采用 10 μ mol/L、20 μ mol/L、30 μ mol/L c-fos 和 c-jun 反义寡核苷酸联合预先作用大脑皮层神经细胞 5 h 后, 再分别加入 15 U/ml 的 IL-1, 培养 20 h 后, 图 3 结果显示 IL-1 能诱导大脑皮层神经细胞分泌 LE, 10 μ mol/L c-fos 和 c-jun 反义寡核苷酸不能抑制 IL-1 诱导的 LE 分泌 ($P > 0.05$), 随联合作用剂量增至 20 μ mol/L 则明显抑制 IL-1 诱导的大脑皮层神经细胞分泌 LE, 并随浓度加大, 抑制效应更明显; 增至 30 μ mol/L 仍不能完全抑制 IL-1 诱导的 LE 分泌, 明显高于未经 IL-1 作用的正常对照 ($0.01 < P < 0.05$). c-fos 及 c-jun 意义寡核苷酸不同浓度联合作用于大脑皮层神经细胞, 不能抑制 IL-1 促 LE 分泌作用。

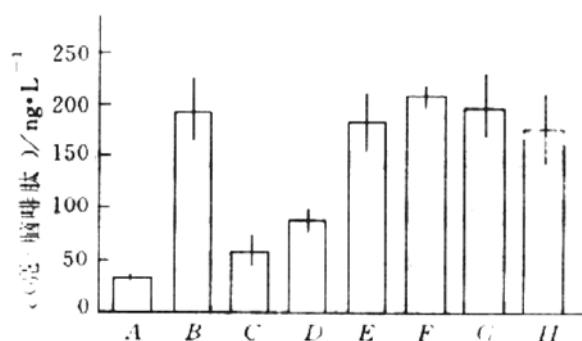


图 3 c-fos 和 c-jun 反义寡核苷酸抑制 IL-1 诱导的大脑皮层神经细胞亮-脑啡肽分泌

A: 正常对照; B: IL-1; C、D、E: 分别为 c-fos, c-jun 反义寡核苷酸 (30 μ mol/L、20 μ mol/L、10 μ mol/L) + IL-1; F、G、H: 分别为 c-fos, c-jun 意义寡聚核苷酸 (30 μ mol/L、20 μ mol/L、10 μ mol/L) + IL-1。

2.3 c-fos 和 c-jun 反义寡核苷酸对 IL-1 诱导大脑皮层神经细胞 β -内啡肽分泌的影响

采用上述相同作用剂量, 作用方式及时间, 经不同浓度的 c-fos 和 c-jun 反义寡核苷酸联合作用大脑皮层神经细胞后, 图 4 结果表明, IL-1 对大脑皮层神经细胞 β -内啡肽有一定促进作用, 10 μ mol/L c-fos 和 c-jun 反义寡核苷酸联合作用能部分抑制 IL-1 促 β -内啡肽分泌

作用, 并随作用浓度增大, 其抑制效率有所增强. *c-fos* 及 *c-jun* 意义寡核苷酸不能抑制 IL-1 促 β -内啡肽作用.

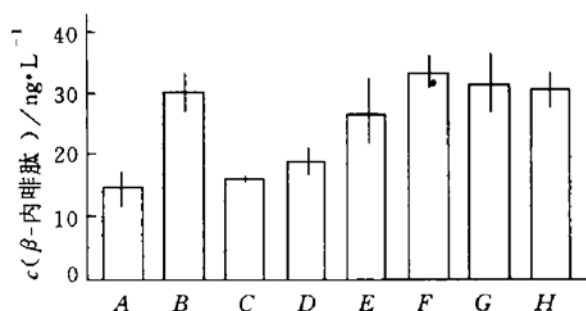


图4 *c-fos* 和 *c-jun* 反义寡核苷酸抑制 IL-1 诱导的大脑皮层神经细胞 β -内啡肽分泌

A: 正常对照; B: IL-1; C、D、E: 分别为反义寡核苷酸 (30 μ mol/L、20 μ mol/L、10 μ mol/L) + IL-1; F、G、H: 分别为 *c-fos*, *c-jun* 意义寡核苷酸 (30 μ mol/L、20 μ mol/L、10 μ mol/L) + IL-1.

3 讨 论

脑内神经细胞的信息传递经跨膜传导机制, 激活细胞内第二信使系统, 在引起细胞瞬时反应的同时, 可激活第三信使, 引起基因转录变化. 即刻早期基因 *c-fos* 和 *c-jun* 所编码的 Fos 和 Jun 蛋白是由第二信使诱导的核蛋白, 在细胞内发挥核内第三信使作用, 二者结合形成的 Fos-Jun 异源二聚体复合物, 为 AP-1 转录因子, 作用于靶基因调控序列中的 AP-1 位点, 调节靶基因表达, 参与细胞长时程调控及细胞表型改变^[6,7].

我们的结果表明, IL-1 能促进 *c-fos* 及 *c-jun* mRNA 瞬时短暂表达, 这与许多因素诱导的 *c-fos* 和 *c-jun* mRNA 表达的时程关系相似, *c-jun* mRNA 减少较 *c-fos* 相对慢, 其原因可能与 mRNA 降解速度及 *c-jun* 家族成员相对较多有关. *c-fos* mRNA 表达受细胞内 cAMP、蛋白激酶 C (PKC) 和 Ca^{2+} -钙调蛋白调控, *c-jun* 表达亦受 PKC 及其他蛋白激酶调控, Ca^{2+} 增多又与 PKC 活性增高密切相关^[10,11], 我们另外实验发现 IL-1 及阿片肽能促进大脑皮层神经

细胞内游离 Ca^{2+} 增加 (资料待发表). 因此, 我们推测 IL-1 及阿片肽促进 *c-fos* 和 *c-jun* mRNA 表达可能与它们作用于相应受体, 促使细胞内 Ca^{2+} 增多及蛋白激酶活性改变, 产生生物学效应有关.

采用 *c-fos*、*c-jun* 和脑啡肽原 (PENK) - CAT 融合基因共转染 F9 畸胎瘤细胞, 发现 *c-fos* 及 *c-jun* 能促进依赖 PENK 启动子的 CAT 报告基因酶活性增高, 提示 PENK 表达受 Fos 及 Jun 蛋白调控^[7]. 但尚未见直接抑制 Fos、Jun 蛋白的合成对 PENK 影响的报道. PENK 基因 -110 至 -72 区是 cAMP 及 PKC 激活剂佛波酯醇 (TPA) 调节 PENK 基因表达所需的 DNA 序列, 具有增强子特性, 在此区, 存在两个基因转录调控序列, 分别为 ENKCRE-1 及 ENKCRE-2, 它们可应答 cAMP 和 TPA 诱导的转录反应, 其中以靠近起始密码子的 ENKCRE-2 尤为重要. 在该增强子区, 有 4 个特定的 DNA 结合蛋白的结合位点, ENKCRE-2 区的 AP-1 结合位点存在是 PENK 转录调控必需成分, 受 Fos、Jun 蛋白形成的 AP-1 转录因子调控^[7,12].

我们联合应用 *c-fos*、*c-jun* 反义寡核苷酸能抑制 IL-1 诱导的大脑皮层神经细胞脑啡肽分泌, 并呈现一定量效关系, 较以往研究更加直接提示 *c-fos* 和 *c-jun* 对 PENK 基因表达的促进作用. 我们的实验显示, 中枢神经系统中 β -内啡肽分泌部分亦受核内第三信使 Fos 及 Jun 调控, 由于 β -内啡肽在大脑皮层明显少于垂体等部位, 因而 IL-1 及 *c-fos*、*c-jun* 反义寡核苷酸对大脑皮层神经细胞 β -内啡肽分泌的不同作用远小于对脑啡肽的影响, β -内啡肽来源于阿黑皮原 (POMC) 基因表达产物的一部分, *c-fos* 和 *c-jun* 对 β -内啡肽调控机制是直接作用于 POMC 基因调控区, 还是通过其他因素间接调控仍待深入研究. 有报道 *c-fos*、*c-jun* 反义寡核苷酸能抑制 IL-1 诱导的 AtT20 垂体细胞 β -内啡肽分泌^[6]. *c-fos* 和 *c-jun* 意义寡核苷酸对 IL-1 诱导大脑皮层脑啡肽及 β -内啡肽分泌无影响, 提示所合成的寡核苷酸本身对细胞无明显

毒性作用,反义寡核苷酸引起的抑制效应非自身毒性所致。

c-fos 和 c-jun 反义寡核苷酸不能完全抑制 IL-1 诱导的大脑皮层神经细胞脑啡肽及 β -内啡肽分泌,特别对基础水平表达无抑制作用,提示脑内脑啡肽及 β -内啡肽分泌,不仅受 c-fos 及 c-jun 调控,可能还受其他调控元件影响,不同调控序列间相互影响,在不同状态下发挥不同作用。

反义寡核苷酸可通过抑制基因转录、转录后加工、翻译等作用原理调控靶基因表达。我们依据 5' 端紧邻翻译起始密码子 ATG 下游编码区的 18 个脱氧核苷酸分别合成的 c-fos 和 c-jun 反义寡核苷酸,与 c-fos、c-jun mRNA 完全互补,可与 mRNA 翻译起始部位发生特异结合,形成 RNA/DNA 双链体,通过空间阻抑作用,使 mRNA 不能起始翻译, RNA/DNA 双链体还可阻止 mRNA 从细胞核转送至细胞质核蛋白体上,并阻止核蛋白体沿 mRNA 上移动。同时核糖核酸酶 RNase H 在抑制翻译过程中亦发挥重要作用,该酶仅能特异识别 RNA/寡脱氧核苷酸杂交体,并水解其中的 RNA,使翻译受到不可逆阻遏^[6,13]。我们将 c-fos、c-jun 反义寡核苷酸同时加入培养的大脑皮层神经细胞中,通过自身穿透进入细胞中,可分别阻止 c-fos、c-jun mRNA 翻译,使 AP-1 转录因子减少,不能开启 PENK 及 β -内啡肽表达。

参 考 文 献

- 1 Plata-Salaman C R. *Neurosci Biobehav Rev*, 1991; **15**: 185
- 2 Olson G A, Olson R D, Kastin A J. *Peptides*, 1993; **14**: 1339
- 3 Rothwell N J, Relton J K. *Neurosci Biobehav Rev*, 1993; **17**: 217
- 4 Relton J K, Rothwell N J. *Brain Res Bull*, 1992; **29**: 243
- 5 Rothwell N J. *TIPS*, 1991; **12**: 430
- 6 Fagarasan M D, Aiello F, Muegge K *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**: 7871
- 7 Sonnenberg J L, Rauscher F J, Morgan J T *et al.* *Science*, 1989; **246**: 1622
- 8 Curran T, Gordon M B, Rubino K L *et al.* *Oncogene*, 1987; **2**: 79

- 9 Ryder K, Nathans D. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; **85**: 8464
- 10 Munoz E, Zubiaga A M, Huber B T. *Eur J Immunol*, 1992; **22**: 2101
- 11 Trejo J, Ramirez M T, Brown J H. *J Cell Biol*, 1990; **111** (part 2): 85a
- 12 Comb M, Mermod N, Hyman S E *et al.* *EMBO J*, 1988; **7**: 3793
- 13 Eng L F. In: Waxman S G ed. *Molecular and cellular approaches to the treatment of neurological disease*. New York: Raven Press, Ltd, 1993: 293~310

Antisense Oligonucleotides of c-fos and c-jun Inhibit Secretion of Opioid Peptides of Rat Corticocerebral Cells Induced by IL-1. Wang Zhaohui, Shan Weisong, Wu Xiru (*Laboratory of Pediatric Neurology, Department of Pediatrics, The First School of Clinical Medicine, Beijing Medical University, Beijing 100034, China*).

Abstract Interleukin-1 (IL-1) and opioid peptides, acting as neuromodulators, play roles in excitotoxicity of neurons. The interaction of IL-1, opioid peptides and immediate early genes c-fos and c-jun in rat corticocerebral cells was studied. The results showed that IL-1 β induced transient and early c-fos and c-jun mRNA expression. The induction of c-fos and c-jun mRNA by IL-1 appeared within 15 min, was highest respectively. Addition to corticocerebral cells of antisense oligonucleotides to c-fos and c-jun, significantly inhibit the secretion of Leu-enkephalin and β -endorphin of antisense oligonucleotides to c-fos and c-jun appeared the dose response curve. These findings suggest that immediate early signals Fos and Jun partly regulate secretion of enkephalin and β -endorphin of corticocerebral cells induced by IL-1.

Key words corticocerebral cell, interleukin-1, opioid peptides, c-fos, c-jun, antisense oligonucleotides