

在 fMLP 刺激的 HL-60 细胞中 PI3-K 介导的肌动蛋白聚合*

崔玉东**

(黑龙江省八一农垦大学基因工程中心, 密山 158308)

稻波修 山盛徹 桑原幹典

(北海道大学兽医学部放射生物学实验室, 札幌 060-0818, 日本)

摘要 趋化肽 fMLP 能够诱导中性粒细胞粘附、游走和吞噬。为了澄清这种趋化反应的发生机理, 将 HL-60 细胞诱导分化为中性粒细胞样细胞, 然后利用激酶特异性抑制剂研究了在 fMLP 刺激下细胞内 PI3-K、p38 和 ERK 激酶在肌动蛋白聚合中的作用。结果 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 PI3-K 抑制物 Wortmannin 抑制 fMLP 诱导的肌动蛋白聚合; 而 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 p38 激酶抑制物 SB203580 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 ERK 激酶抑制物 PD098059 对 fMLP 诱导的肌动蛋白聚合没有影响, 但 p38 和 ERK 在不同程度上受到 PI3-K 的调节。这说明 PI3-K 介导的肌动蛋白聚合信号传导途径不同于 PI3-K 介导的 p38 和 ERK 激活途径。

关键词 HL-60 细胞, PI3-K, 肌动蛋白聚合, fMLP

学科分类号 Q26

中性粒细胞在急性炎症反应中起着杀灭病原微生物的重要作用。这种作用是由趋化因子如趋化肽 N-甲酰-甲硫氨酸-亮氨酸苯丙氨酸 (fMLP) 与中性粒细胞膜受体结合后细胞启动一系列包括粘附、游走和吞噬等能动性反应过程来完成的。在此过程中, 中性粒细胞不断地发生细胞运动所必需的肌动蛋白聚合和解聚^[1,2]。从中性粒细胞接受刺激到产生能动性反应过程的某些信号分子已经得到证实, 如小分子质量 GTP 结合蛋白 Rho、Rac 和 Cdc42 等^[3]。磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase PI3-K) 是重要的细胞内信号传导激酶, 它参与细胞增殖、凋亡、运动、粘附以及过氧化物产生等多种细胞功能^[4-7], 并能够激活有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPKs)^[7,8], 而且认为 MAPKs 家族的 p38 和 ERK 可能也参与细胞的趋化作用^[9,10]。但 PI3-K、p38 和 ERK 是否参与肌动蛋白聚合的信号传导过程尚不十分清楚。本研究利用各种特异性激酶抑制剂初步研究了 PI3-K、p38 和 ERK 对 fMLP 刺激的中性粒细胞样 HL-60 细胞肌动蛋白聚合的作用, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Wako 化工有限公司 (日本大坂); fMLP 购自 Sigma 化学公司; 激酶 PI3-K 抑制物 Wortmannin、P38 抑制物 SB203580、ERK 抑制物 PD098059 和 PKC 抑制物 GF109203x 购自 Carbiochem 公司; RPMI1640 培养基、胎牛血清和

Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 购自 Gibco BRL 公司; GreenTM488 Phalloidin 购自 Molecular Probes, Inc (Oregon); 磷酸化 P38 (Thr180/Tyr182) 抗体、磷酸化 ERK (T202/Y204) 抗体和 HRP 标记的抗兔 IgG 购自 New England Biolabs 公司。

1.2 细胞培养和诱导分化

HL-60 细胞取自 RIKEN Cell Bank (日本), 于 37℃ 5% CO₂ 条件下培养于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 RPMI1640 培养基中。连续传代 5 次后, 将 HL-60 细胞培养于含 1.2% DMSO 的培养基中 5 d, 诱导分化成中性粒细胞样细胞。然后收获, 用胎蓝染色法检查细胞存活率, 存活率 90% 以上者用于试验。

1.3 肌动蛋白聚合的流式细胞仪分析

将细胞悬浮于含 0.5 mmol/L CaCl₂ 和 1 mmol/L MgCl₂ 的 HBSS 中, 加入激酶抑制物, 与对照组一起于 37℃ 温育 20 min。每个样品 (10⁶ 个细胞) 中加入终浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 fMLP, 于 37℃ 作用 30 s, 加入 4 倍体积的 4.5% 多聚甲醛。于 4℃ 作用 10 min 后再置室温 30 min 进行固定。然后将细胞洗一次, 悬浮于染色液 (0.16 $\mu\text{mol/L}$ Oregon GreenTM 488 Phalloidin 的 100 mg/L 溶血磷脂酰胆碱/磷酸盐缓冲液) 中, 于室温避光温育 30 min。最后用 PBS 洗二次, 去除

* 日本五峰生命科学国际基金资助, 在日本北海道大学兽医放射生物学实验室完成。

** 通讯联系人。

Tel: 0453-5070758, E-mail: cuiyudong@yahoo.com

收稿日期: 2000-06-20, 接受日期: 2000-09-28

未结合的 Phalloidin, 用流式细胞仪 (XL-MCL Beckman Coulter) 对样品进行分析。

1.4 蛋白质印迹

为检测 PI3-K 受 Wortmannin 抑制后对 p38 和 ERK 的影响, 将细胞悬浮于终浓度为 0.5 mmol/L CaCl_2 、1 mmol/L MgCl_2 的 HBSS 中, 加入 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 Wortmannin, 并与对照样品一起于 37℃ 作用 5 min, 用终浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 fMLP 于 37℃ 刺激一定时间, 立即加入 10 倍量的冰浴 HBSS 终止刺激。然后离心沉淀细胞, 并重悬浮于裂解缓冲液 (20 mmol/L HEPES pH 7.4、2 mmol/L EGTA、50 mmol/L 甘油磷酸盐、1% Triton X-100、10% 甘油、2 mg/L 抗蛋白酶肽、1 mmol/L Na_3VO_4 、2 mg/L pepstatin A、1 mmol/L DTT) 中, 置冰上 30 min 后, 将细胞于冰上用超声波裂解, 并以 $15\,000 \times g$ 离心 30 min。取上清与

等量的 $2 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液 (0.125 mol/L Tris-HCl pH 6.8、10% 巯基乙醇、4% SDS、20% 甘油、0.1% (质量体积比) 溴酚蓝) 混合, 煮沸 3 min, 经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至硝酸纤维素膜上, 将膜置于 5% 脱脂乳的 TBST 室温封闭 1~3 h, 再用 1:2 000 稀释的第一抗体于 4℃ 过夜, 然后以 1:2 000 稀释的 HRP 标记的抗兔第二抗体于室温 1 h, 用 ECL 增强化学发光法显影。

2 结 果

2.1 fMLP 诱导的肌动蛋白聚合

对 fMLP 刺激的 HL-60 细胞经 Oregon GreenTM488 Phalloidin 染色后, 用流式细胞仪分析肌动蛋白聚合发生过程。在 fMLP 刺激下, 细胞内 F-肌动蛋白水平立即升高, 在 15 s 到 30 s 之间达到高峰, 然后逐渐降低 (图 1)。

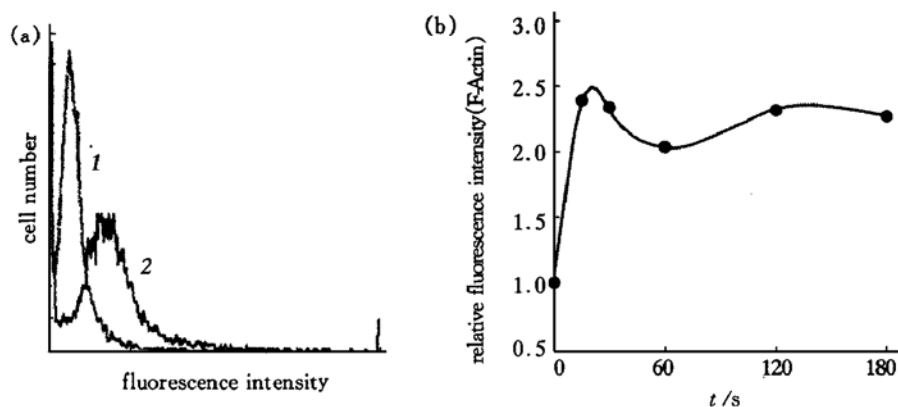


Fig. 1 Flow cytometric analysis of actin polymerization in fMLP-stimulated HL-60 cells

(a) Flow cytometric histograms in the HL-60 cells stimulated with 0.1 $\mu\text{mol/L}$ fMLP for 0 s (1) and 30 s (2). (b) Time-course of actin polymerization data was expressed as relative fluorescence intensity.

2.2 激酶抑制物对肌动蛋白聚合的影响

对几种激酶抑制物处理的细胞用流式细胞仪检测 fMLP 刺激后的肌动蛋白聚合情况。结果用 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Wortmannin 处理的细胞对 fMLP 刺激后肌动蛋白聚合表现出明显的抑制作用, 而用

50 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 和 50 $\mu\text{mol/L}$ PD098059 处理的细胞对 fMLP 刺激引起的肌动蛋白聚合没有明显影响 (图 2)。这说明 fMLP 刺激后, PI3-K 参与 HL-60 细胞肌动蛋白聚合过程。

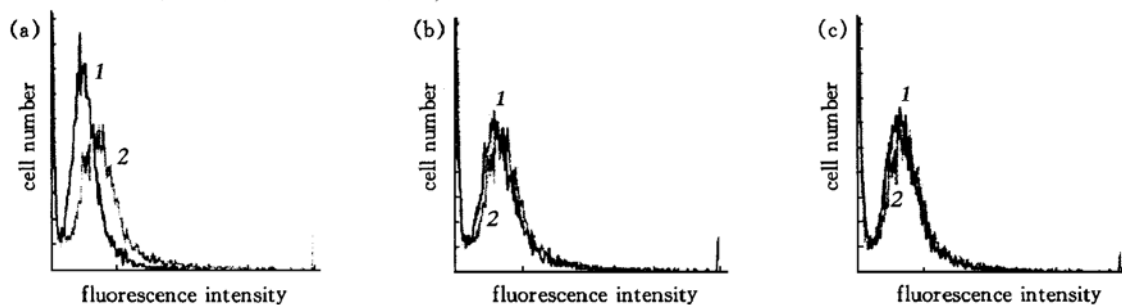


Fig. 2 Effect of drug treatment on the actin polymerization cells were stimulated with 0.1 $\mu\text{mol/L}$ fMLP for 30 s with (1) or without (2) drug treatment

Drug-treatment was carried out in prior to the stimulation as described in the text. Drug utilized in the experiments were as follow: (a) 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Wortmannin, (b) 50 $\mu\text{mol/L}$ SB203580, (c) 50 $\mu\text{mol/L}$ PD098059. A representative experiment of 4 performances is shown.

2.3 PI3-K 抑制物对 p38 和 ERK 磷酸化的作用

通过蛋白质印迹检测 PI3-K 对 p38 和 ERK 激酶磷酸化的影响. 在 fMLP 刺激后, 对照组 p38 和 ERK 激酶迅速激活, 大约于刺激后 1 min 磷酸化达到最大程度, 然后逐渐去磷酸化; 而用 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Wortmannin 处理细胞, 使 PI3-K 受到抑制后, 对 p38 激酶磷酸化仅表现出较弱的抑制作用, 对 ERK 激酶磷酸化呈现明显的抑制作用 (图 3), 说明 p38 和 ERK 受到 PI3-K 不同程度的调节.

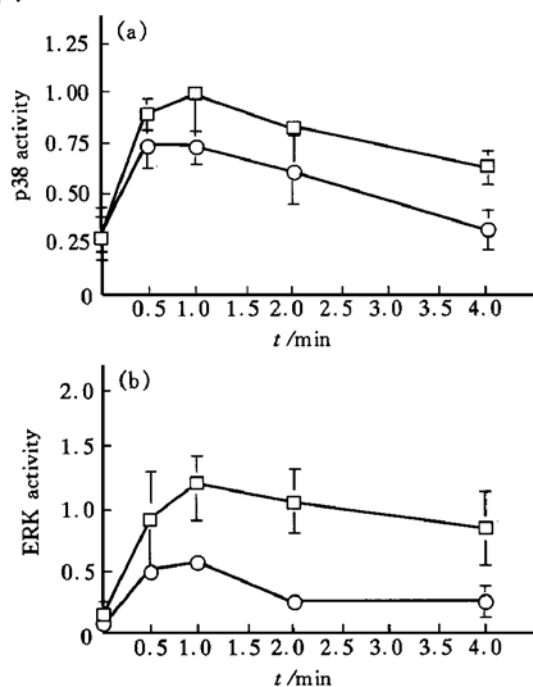


Fig. 3 Time course of the effects of Wortmannin on the activation of p38 (a) and ERK (b) kinases by fMLP

Intensities of these kinases bands in autograph were measured by densitometric scanning, then the intensity ratio of kinase to actin was calculated. Each point in the time course represents the mean $\pm$ s of three separated experiments with standard error bars. □ — □: control; ○ — ○: Wortmannin.

3 讨 论

PI3-K 是一组进化上保守的脂质激酶, 调节多种细胞功能, 包括 fMLP 刺激的中性粒细胞粘附、细胞游走和吞噬等. 趋化肽 fMLP 作用于中性粒细胞表面的 G 蛋白偶联受体, 通过 G 蛋白的 $\beta\gamma$ 亚单位激活 PI3-K γ , 进而 PI3-K 催化磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸 (PtdIns (4, 5) P₂) 转化为磷脂酰肌醇-3, 4, 5-三磷酸 (PtdIns (3, 4, 5) P₃), 引起 Ca^{2+} 流动、细胞游走、过氧化物产生等^[6, 7, 11, 12]. Wortmannin 是一种特异性的 PI3K 活性抑制剂,

与 PI3-K 的催化亚基发生特异的不可逆的结合, 从而抑制 PI3-K 的活性, 而且在 $\leq 0.1 \mu\text{mol/L}$ 的浓度下, 使 fMLP 或其他激动剂刺激的中性粒细胞 PI3-K 活性完全受到抑制^[12~14]. 促分裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 是一个胞浆蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶家族, 包括 p38 MAPK、胞外信号调节激酶 (ERK) 和 c-Jun N 端激酶 (JNK). p38 和 ERK 参与细胞重要反应的调节过程, 如凋亡、过氧化物产生等^[15~17]. 抑制剂 SB203580 和 PD098059 分别为 p38 MAPK 和 ERK 的特异性抑制剂, 二者均在 50 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度时使 p38 和 ERK 活性完全抑制 (结果未列出).

中性粒细胞在趋化肽作用下所发生的趋化作用, 需要肌动蛋白分子不断聚合和解聚^[1, 2]. 本实验证实, 在 fMLP 刺激下, 细胞内出现瞬时 F-肌动蛋白水平升高, 表明肌动蛋白发生聚合. 分别用 PI3-K、p38 和 ERK 的抑制物处理细胞后, Wortmannin 对这一反应有明显的抑制作用, 说明 PI3-K 参与肌动蛋白聚合过程; 而 SB203580 和 PD098059E 对这一反应则没有明显影响, 即 p38 和 ERK 不参与这个过程, 从而证实了 PI3-K 激活可引起肌动蛋白聚合. Eberle^[18] 研究推测 PI3-K 可能通过催化形成的 PtdIns (3, 4, 5) P₃ 而参与肌动蛋白的聚合和解聚调节. 我们还检测了用 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Wortmannin 抑制 PI3-K 后的 p38 和 ERK 活性, 结果表明 PI3-K 明显地调节 ERK, 而 p38 的调节作用不明显. 以往对 MAPKs 研究认为, ERK 似乎参与中性粒细胞的趋化作用^[9], p38 参与 TGF- β 1 诱导的中性粒细胞趋化反应^[10]. 本试验未观察到 ERK 和 p38 对 fMLP 刺激的 HL-60 细胞肌动蛋白聚合发生作用, 但是它们是否参与肌动蛋白聚合以外的其他趋化环节, 尚待进一步研究. 以上说明, 在 fMLP 刺激的 HL-60 细胞中, PI3-K 参与肌动蛋白聚合的调节过程. 尽管 p38 和 ERK 激活也受到 PI3-K 不同程度的调节, 但二者不参与肌动蛋白聚合过程, 即 PI3-K 调节的肌动蛋白聚合途径不同于 p38 和 ERK 激活途径.

参 考 文 献

- 1 Laufferburger D A, Horwitz A F. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 1996, **84** (3): 359~369
- 2 Mitchison T J, Cramer L P. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, 1996, **84** (3): 371~379
- 3 Nobes C D, Hall A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 1995, **81** (1): 53

- ~ 62
- 4 Capodici C, Hanft S, Feoktistov M, *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase mediates chemoattractant-stimulated, CD11b/CD18-dependent cell-cell adhesion of human neutrophils: evidence for an ERK-independent pathway. *J Immunol*, 1998, **160** (4): 1901~1909
 - 5 Vlahos C J, Matter W F, Brown R F, *et al.* Investigation of neutrophil signal transduction using a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol*, 1995, **154** (5): 2413~2422
 - 6 Toker A, Cantley L C. Signalling through the lipid products of phosphoinositide 3-OH kinase. *Nature*, 1997, **387** (6634): 673~676
 - 7 Sasaki T, Irie Sasaki J, Jones R G, *et al.* Function of PI3K γ in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*, 2000, **287** (5455): 1040~1046
 - 8 Knall C, Scott W G, Johnson J L. Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (7): 3052~3057
 - 9 Kuroki M, O'Flaherty J T. Differential effects of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor on human neutrophil responses to chemotactic factors. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **232** (2): 474~477
 - 10 Hannigan M, Zhan L, Ai Y, *et al.* The role of p38 MAP kinase in TGF- β -induced signal transduction in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **246** (1): 55~58
 - 11 Stephens L R, Jackson T R, Hawkins P T. Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system?. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1179** (1): 27~75
 - 12 Arceraro A, Wymann M P. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J*, 1993, **296** (pt 2): 297~301
 - 13 Bondeva T, Pirola L, Bulgarelli-Leva G, *et al.* Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3K γ to the protein kinases PKB and MAPK. *Science*, 1998, **282** (5387): 293~296
 - 14 Okada T, Sakuma L, Fukui Y, *et al.* Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 1994, **269** (5): 3563~3567
 - 15 Aoshiba K, Yasui S, Hayashi M, *et al.* Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils. *J Immunol*, 1999, **162** (3): 1692~1700
 - 16 Klein J B, Rane M J, Scherzer J A, *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J Immunol*, 2000, **164** (8): 4286~4291
 - 17 Hii C S, Huang Z H, Bilney A, *et al.* Involvement of protein kinase C, p38 MAP kinase and ERK in arachidonic acid-stimulated superoxide production in human neutrophils. *Adv Exp Med Biol*, 1999, **469**: 365~370
 - 18 Eberle M, Traynor-Kaplan A E, Sklar L A, *et al.* Is there relationship between phosphatidylinositol trisphosphate and F-actin polymerization in human neutrophils?. *J Biol Chem*, 1990, **265** (28): 16725~16728

PI3-K Mediates Polymerization of Actin in fMLP-Stimulated HL-60 Cells*

CUI Yu-Dong**

(Center of Gene Engineering, Heilongjiang August First Agricultural University, Mishan 158308, China)

INANAMI O, YAMAMORI T, KUWABARA M

(Laboratory of Radiation Biology, Graduate School of Veterinary medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan)

Abstract The chemotactic peptide fMLP was known to induce adhesion, migration and phagocytosis of neutrophil. To clear the mechanism of the chemotaxis, the effects of PI3-K, p38 and ERK on actin polymerization were studied with the inhibitors of these kinases in neutrophil-like, differentiated HL-60 cells stimulated with fMLP. 0.1 μ mol/L Wortmannin (PI3-kinase inhibitor) inhibited the fMLP-induced polymerization of actin. 50 μ mol/L SB203580 (p38 inhibitor) and 50 μ mol/L PD98059 (ERK inhibitor) did not inhibit it, though p38 and ERK were regulated by PI3-K. These results suggest the signaling pathway of actin polymerization mediated by PI3-K was different from that of p38 and ERK activation mediated by PI3-K.

Key words HL-60 cell, PI3-K, actin polymerization, fMLP

* This work was supported by Goho Life Sciences International Foundation (Japan).

** Corresponding author. Tel: 86-453-5070758, E-mail: cuiyudong@yahoo.com

Received: June 20, 2000 Accepted: September 28, 2000