BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 Acta Pharmacologica Sinica 1993 Sep; 14 (5): 447—449

蛋白激酶C抑制剂和钙调素抑制剂对小鼠腹腔巨噬细胞释放肿瘤坏死因子的抑制作用[1]

R965.2

田 鸣[2]，张俊平，钱定华，李广川[2] （第二军医大学药学院中西药研究室，上海200433，中国）

Inhibitory effects of protein kinase C inhibitor and calmodulin antagonist on tumor necrosis factor production by mouse macrophages[1]

TIAN Ming[2], ZHANG Jun-Ping, QIAN Ding-Hua, LI Guang-Chuan[2] (*Research Laboratory of Natural and Synthetic Drugs, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*)

ABSTRACT Mouse peritoneal macrophages were primed with calcium ionophore calcimycin 1 μmol·L^{-1} for 8 h and then elicited by lipopolysaccharides (LPS, 10 ng·ml^{-1}) for 6 h to induce tumor necrosis factor (TNF), measured by cristal violet staining assay using murine fibroblast L929 cells. Protein kinase C (PKC) inhibitor, 1-(5-isoquinolinesulphonyl)-2-methylpiperazine (H-7) and calmodulin (CaM) antagonist, *N*-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7) were studied on LPS-induced TNF production by macrophages. Addition of H-7 (0.31—50 μg·ml^{-1}) and W-7 (10—4000 ng·ml^{-1}) simultaneously with LPS to the culture medium suppressed LPS-induced TNF production in a concentration-dependent manner. When macrophages were pretreated with W-7 (10 ng·ml^{-1}), LPS-induced TNF production was completely inhibited at 8 h. These results suggest that TNF production by macrophages may be dependent on the PKC and CaM.

KEY WORDS protein kinase C; calmodulin; tumor necrosis factor; lipopolysaccharides; calcimycin; macrophages; fibroblasts

摘要 蛋白激酶C (PKC) 抑制剂 H-7 (0.31 — 50 μg·ml^{-1}) 和钙调素 (CaM) 拮抗剂 W-7 (10 — 4000 ng·ml^{-1}) 皆可浓度依赖地抑制脂多糖诱导卡西霉素启动的小鼠腹腔巨噬细胞释放肿瘤坏死因子(TNF). W-7 (10 ng·ml^{-1})抑制 TNF 释放的最佳时间为8 h. 提示巨噬细胞释放 TNF 可能依赖于 PKC 和 CaM.

关键词 蛋白激酶C；钙调素；肿瘤坏死因子；脂多糖；卡西霉素；巨噬细胞；成纤维细胞

巨噬细胞(MΦ)需要经历启动和诱出二个过程才能充分激活、合成和分泌肿瘤坏死因子TNF[1,2]. 卡西霉素(calcimycin, Cal)可模拟γ-干扰素或巨噬细胞活化因子启动 MΦ[3,4]. 1-(5-异喹啉磺酰基)-2-甲基哌嗪(H-7)和 N-(6-氨已基)-5-氯-1-萘磺酰胺(W-7)分别是蛋白激酶C (PKC)抑制剂和钙调素(CaM)拮抗剂，能够抑制血小板、中性粒细胞和巨噬细胞内 PKC 和 CaM 依赖蛋白激酶催化的蛋白磷酸化. 导致某些生物活性物质的合成和释放减少[5]. 为了解 PKC 和 CaM 在 TNF 释放中的作用，本文选择 H-7和 W-7研究它们对巨噬细胞释放 TNF 的影响.

MATERIALS AND METHODS

药品与试剂 H-7为浅黄色针状结晶，mp 138—140℃，纯度>99%. W-7为白色针状结晶，mp 219—220℃，纯度>99%. H-7和 W-7分别用 RPMI 1640培养基(Sigma)和乙醇(试验终浓度<0.02%)配成贮液，临用前用培养液稀释至所需浓度. Lipopolysaccharides (LPS, 0111:B4)和 calcimycin 为 Sigma 产品.

TNF 的诱生 ICR 小鼠，♀，24.2±*s* 2.0 g，ip 3%硫代乙醇酸钠培养液(TG-broth) 1 ml/鼠. d 4收集腹腔渗出细胞(PEC)，经 PBS 洗涤2次，然后加入含10%新生牛血清 RPMI 1640培养液和 Cal，调整细胞浓度为2×10^6·ml^{-1}，Cal 1 μmol·L^{-1}. 将此悬液1 ml 加入24孔培养板中，置于5% CO_2培养箱温育8 h. 以

Received 1991-08-30 Accepted 1993-03-04
[1] Project supported by the Shanghai Natural Science Foundation, № (88)BB03403.
[2] Now in *Harbin № 3 Pharmaceutical Factory, Harbin 150010, China.*

PBS 洗2次，加入含有药物的培养液1 ml 继续培养6 h. 取上清液，−30℃保存待测. 另有部分实验则将试验药物与 MΦ 温育后，用培养基洗2次再加 LPS 诱出.

TNF 生物活性测定 以 L929细胞为靶细胞的细胞毒结晶紫染色法[6]. 样品中 TNF 单位数为样品杀伤50%靶细胞(5×10^4)的稀释度的倒数.

显著性检验 采用 t 检验.

RESULTS

TNF 诱生最佳条件的选择 选择不同浓度 Cal 与 TG 应答的小鼠腹腔 MΦ 共同温育8 h，然后加入 LPS (10 ng·ml^{-1})诱出6 h. 结果发现经 TG 应答的 MΦ 不能自发分泌 TNF，0.1，1，Cal 10 μmol·L^{-1}启动 MΦ 分泌 TNF 分别为161±6，270±13，30±16 U·ml^{-1}. 为此选择 Cal 1 μmol·L^{-1}启动 MΦ，试验与不同浓度的 LPS (1—10 000 ng·ml^{-1})温育8 h 分泌 TNF 的情况(Tab 1). LPS 在1 ng·ml^{-1}浓度下已明显地刺激 MΦ 分泌 TNF，在 10 — 50 ng·ml^{-1}时诱出作用最强.

Tab 1. Eliciting effects of lipopolysaccharides on tumor necrosis factor production by macrophages primed with calcimycin 1 μmol·L^{-1}. $n=4$, $\bar{x}\pm s$. $^cP<0.01$ *vs* control.

LPS (ng·ml^{-1})	TNF activity (U·ml^{-1})
Control	0±0
1	94±50^c
10	201±10^c
50	219±3^c
100	83±29^c
1000	38±8^c
10000	114±19^c

MΦ 与 LPS 10 ng·ml^{-1}或10 μg·ml^{-1}温育不同时间，收集上清液并测其 TNF 活性，发现不论是 LPS 10 ng·ml^{-1}或10 μg·ml^{-1}刺激 MΦ 6 h，上清液中 TNF 活性最高(Tab 2). 我们选择实验的最佳条件为1 μmol·L^{-1}启动剂 Cal 作用8 h，10 ng·ml^{-1}诱出剂 LPS 作用6 h.

Tab 2. Lipopolysaccharides-induced tumor necrosis factor production by macrophages primed with calcimycin 1 μmol·L^{-1}. $n=4$, $\bar{x}\pm s$. $^cP<0.01$ *vs* control.

Time (h)	TNF activity (U·ml^{-1}) at LPS (ng·ml^{-1}) of 10	10 000
0	0±0	0±0
2	79±10^c	74±22^c
4	129±40^c	148±14^c
6	275±15^c	227±5^c
8	228±29^c	132±45^c
12	81.8±1.4^c	54±10^c
24	45±6^c	38±3^c

H-7和 W-7对 TNF 分泌的抑制作用 H-7 (0.31 — 50 μg·ml^{-1}) 和 W-7 (10 — 4000 ng·ml^{-1})与 MΦ 温育6 h，能浓度依赖地抑制 LPS 对 TNF 诱出作用，两者抑制 TNF 释放与它们对 MΦ 的存活和粘附无关(Tab 3).

Tab 3. Inhibitory effects of H-7 and W-7 on LPS-induced TNF production by macrophages primed with calcimycin. TNF activities in macrophage culture supernatants were measured by cristal violet staining assay using mouse fibroblast L929 cells. $n=4$, $\bar{x}\pm s$. $^aP>0.05$, $^bP<0.05$, $^cP<0.01$ *vs* control.

Treatment	TNF activy (U·ml^{-1})
Control	223±16
H-7 (μg·ml^{-1})	
0.31	254±3^b
0.62	203±30^a
1.25	71±21^c
2.5	54±3^c
5	36±22^c
50	23±17^c
W-7 (ng·ml^{-1})	
10	187±64^a
20	108±32^c
40	67±21^c
400	52±14^c
4000	56±16^c

W-7 (10 ng·ml^{-1})与 MΦ 预先温育不同时间，经洗涤后加入 LPS 诱出6 h，发现抑制 TNF 释放的作用随预处理时间延长而加强，8

h 以后抑制作用维持在一定水平(Tab 4).

Tab 4. Kinetics of W-7 on LPS-induced TNF production. Calmodulin primed macrophages were pretreated wtih W-7 (10 ng·ml^{-1}) for various time then elicited with LPS for 6 h. $n=4$, $\bar{x}\pm s$.

Time (h)	TNF activity (U·ml^{-1})
0	232±2
2	247±30
4	156±17
6	95±12
8	72±2
24	99±15

DISCUSSION

结果表明：W-7和 H-7显著地抑制 LPS 诱导 Cal 启动的小鼠腹腔 MΦ 释放 TNF. LPS 是 TNF 最有效诱出剂之一，能迅速激活 PKC 而增加胞内特定蛋白的磷酸化[7]. W-7是有效的 CaM 拮抗剂，抑制 CaM 依赖的蛋白磷酸化的 Ki 值为12 μmol·L^{-1}. H-7能抑制多种蛋白激酶催化的蛋白磷酸化，但主要是选择性抑制钙、磷脂依赖的蛋白激酶，抑制 PKC 的 Ki 值为6 μmol·L^{-1}[8,9]. 本实验 W-7和 H-7试验浓度与它们抑制 CaM 和 PKC 浓度相符，提示 W-7和 H-7改变 MΦ 分泌 TNF 的功能可能是通过抑制 CaM 和 PKC 来实现的. 已知某些涉及钙透膜循环所引起的细胞反应过程中往往是 PKC 和 CaM-Ca^{2+}复合体协同起作用[10]，可以认为 MΦ 释出 TNF 过程中涉及钙透膜循环，而 PKC 和 CaM-Ca^{2+}复合体的作用是相互关联的，任何一者受抑制均可减少 TNF 释出.

ACKNOWLEDGMENT 本室赵京浦合成和提供 W-7和 H-7.

REFERENCES

1 Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that *causes necrosis of tumors.*
Proc Natl Acad Sci USA 1975; **72**: 3666—70.

2 Pace JL, Russell SW, Torres BA, Johnson HM, Gray PW. Recombinant mouse γ interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing.
J Immunol 1983; **130**: 2011—3.

3 Johnson HM, Torres BA. Mechanism of calcium ionophore A23187-induced priming of bone marrow-derived macrophages for tumor cell killing: relationship to priming by interferon.
Proc Natl Acad Sci USA 1985; **82**: 5959—62.

4 Somers SD, Weiel JE, Hamilton TA, Adams DO. Phorbol esters and calcium ionophore can prime murine peritoneal macrophages for tumor cell destruction.
J Immunol 1986; **136**: 4199—205.

5 Hidaka H, Hagiwara M. Pharmacology of the isoquinoline sulfonamide protein kinase C inhibitors.
Trends Pharmacol Sci 1987; **8**: 162—4.

6 Flick DA, Gifford GE. Comparison of *in vitro* cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor.
J Immunol Methods 1984; **68**: 167—75.

7 Lei MG, Chen TY, Morrison DC. Lipopolysaccharide/Lipid A receptors on lymphocytes and macrophages.
Int Rev Immunol 1990; **6**: 223—35.

8 Hidaka H, Inagaki M, Kawamoto S, Sasaki Y. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C.
Biochemistry 1984; **23**: 5036—41.

9 Tanaka T, Ohmura T, Yamakado T, Hidaka H. Two types of calcium-dependent protein phosphorylations modulated by calmodulin antagonists: naphthalenesulfonamide derivatives.
Mol Pharmacol 1982; **32**: 408—12.

10 Rasmussen H. The cycling of calcium as an intracellular messenger.
Scientific American 1989; **261**: 44—57.