

## 亚硝基化谷胱甘肽还原酶: 一个调控炎症反应的新分子\*

吴凯源<sup>1, 2)\*\*</sup> 张玉英<sup>1, 2)\*\*</sup> 粟文婷<sup>1)</sup> 陈畅<sup>1, 2)\*\*\*</sup>

<sup>1)</sup>中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; <sup>2)</sup>中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要** 炎症因子的表达调控是炎症反应的关键步骤, 与自身免疫疾病以及癌症等密切相关。一氧化氮(nitric oxide, NO)在炎症因子表达调控中具有重要作用, 但已有的研究多关注于 NO 合成对炎症因子的调控作用, 而对 NO 代谢的作用知之甚少。亚硝基化谷胱甘肽还原酶(S-nitrosoglutathione reductase, GSNOR)是体内 NO 信号通路代谢调控的关键蛋白。本研究发现脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)在 RAW264.7 细胞中上调诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的同时下调 GSNOR 的转录和蛋白质表达, 该下调作用依赖 MEK1/2、p38 和 PI3K 信号通路。抑制 GSNOR 可促进 LPS 诱导的炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达, 而过表达 GSNOR 作用相反。抗炎药物曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA)能够挽回 LPS 对 GSNOR 的下调作用, 并且 GSNOR 抑制剂削弱了 TSA 对炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  转录的抑制效应。这些结果表明: GSNOR 是一个新的重要炎症调控分子, 它可能成为调控 NO 介导的炎症相关信号通路的新的潜在靶点, 上调 GSNOR 可能是抑制炎症的新思路。本研究揭示了巨噬细胞通过上调 iNOS 和下调 GSNOR 共同增强免疫炎症反应的新机制, 拓展了对 NO 代谢在炎症反应中作用机制的认识。

**关键词** 亚硝基化谷胱甘肽还原酶(GSNOR), 脂多糖(LPS), NO, 炎症因子

**学科分类号** Q291, R392.12

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00131

炎症反应是机体响应细菌、异物、化学因子以及坏死组织等损伤因子所发生的防御反应。炎症因子的诱导表达是炎症反应的关键步骤, 它可以调控炎症反应的发生、发展以及损伤组织的修复<sup>[1]</sup>。炎症因子表达失调与过敏、慢性炎症、自身免疫疾病以及癌症密切相关<sup>[2-3]</sup>。

一氧化氮(nitric oxide, NO)对炎症因子的表达调控已有很多报道<sup>[4-6]</sup>。例如: NO 供体能上调人外周血单核细胞中 IL-6 的表达<sup>[7]</sup>, 而 NO 合酶 NOS 的抑制剂 NG-monomethyl -arginine (NMMA)几乎能完全抑制 RAW264.7 细胞中 IL-1 的表达<sup>[8]</sup>。利用 NO 的供体上调或下调不同炎症因子的表达已被广泛用于调控炎症反应的进程<sup>[7, 9-10]</sup>。以往的相关研究多关注于一氧化氮合成对炎症因子的调控, 尤其是对诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的作用研究较多。但随着对 NO 信号通路的深入研究, 越来越多的证据表明体内 NO 信号通路不仅受到 NO 合成的调控, 还和 NO 代谢

密切相关<sup>[11]</sup>。所以, NO 代谢对炎症因子表达是否也具有调控作用亟待揭示。

亚硝基化谷胱甘肽还原酶(GSNOR)是体内的亚硝基化谷胱甘肽(S-nitrosoglutathione, GSNO)主要代谢酶<sup>[12]</sup>。GSNO 是细胞内 NO 的主要存在形式, GSNOR 通过代谢 GSNO 参与调控体内的 NO 信号通路, 对呼吸系统、心血管系统、神经系统的功能发挥都具有重要生理意义<sup>[13]</sup>。与 NO 合酶相比, GSNOR 作为内源 NO 主要代谢酶, 其对炎症因子的直接调控还知之甚少。脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌外膜的主要组成成分, 它可以激活巨噬细胞的

\* 国家重点基础研究发展计划(973)(2012CB911000, 2011CB503900)和国家自然科学基金(31030023)资助项目。

\*\* 共同第一作者。

\*\*\* 通讯联系人。

Tel: 010-64888406, E-mail: changchen@moon.ibp.ac.cn

收稿日期: 2013-04-18, 接受日期: 2013-05-24

炎症反应, 促进 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等炎症因子的表达<sup>[4]</sup>. 在本研究中, 我们以 LPS/IFN- $\gamma$  诱导 RAW264.7 细胞为模型, 研究炎症反应中 GSNOR 的变化以及其对炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的调控作用, 以期揭示以 GSNOR 为代表的 NO 代谢调控在炎症反应中的作用.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

所有的培养基均购于 GIBCO 公司; TRIZOL 试剂购于 Invitrogen 公司;  $\beta$ -actin 小鼠单克隆抗体(sc-8432)、iNOS 小鼠单克隆抗体(sc-7271)购于美国 Santa Cruz 公司; GSNOR 兔多克隆抗体由上海英基公司制备及纯化; 一氧化氮荧光探针(DAF-FM DA)、LPS、IFN- $\gamma$ 、TSA 购于美国 Sigma 公司; Real-time PCR mixture 购于北京康为世纪生物科技有限公司.

### 1.2 细胞培养与处理

小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7(ATCC 号:

TIB-71)用 DMEM 培养基(其中含有 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素及 100 mg/L 链霉素)培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 环境. 需要药物处理的细胞于传代后 24 h 加入相应剂量药物, 1 mg/L LPS 和 1  $\mu$ g/L IFN- $\gamma$ 、50 nmol/L 曲古抑菌素 A(TSA)、GSNOR 抑制剂 C3(33 nmol/L), 抑制剂需提前 30 min 加入, 在选定的时间点收集细胞样品进行检测.

### 1.3 提取总 RNA 及 Real-time PCR 分析

根据 Invitrogen 公司提供的说明书, 使用 TRIZOL 试剂, 辅以氯仿、异丙醇和 75%乙醇提取已处理的 RAW264.7 细胞总 RNA. 用紫外分光光度计测定溶解后的 RNA 浓度, 取 2 000 ng 反转录为 cDNA. 采用 Real-time PCR 技术定量相关基因的转录水平, 设计的扩增引物序列见表 1. 反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s 及 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 40 个循环. 实验结果采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup> 方法对数据进行统计学分析.

Table 1 Sequences of primers used for the amplification of PCR

Primers	Forward	Reverse
$\beta$ -Actin	5' GGCTGTATTCCCCTCCATCG 3'	5' CCAGTTGGTAACAATGCCATGT 3'
iNOS	5' GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA 3'	5' GTGGACGGGTCGATGTCAC 3'
GSNOR	5' GTGGAGAATGCAAGTTTGTCTG 3'	5' CCCTGAGTGACCCCTATTTTCTG 3'
IL-6	5' TGGAGTCACAGAAGGAGTGGCTAAG 3'	5' TCTGACCACAAGTGAGGAATGTCCAC 3'
IL-1 $\beta$	5' GCTACCTGTGTCCTTCCCGTGG 3'	5' TTGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTG 3'
TNF- $\alpha$	5' GGCAGGTTCTGTCCCTTCACTC 3'	5' CACTTGGTGGTTTGTCTACGACG 3'

### 1.4 Western blotting 检测

细胞用 RIPA 裂解液(50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, pH 7.4)于冰上裂解 20 min, 离心(12 000 *g* 5 min, 4 $^{\circ}$ C)取上清, 加入 2  $\times$  上样缓冲液制成样品, 100 $^{\circ}$ C 加热 15 min 后用 10% SDS-PAGE 分离, 电转移蛋白至 NC 膜上(350 V/100 mA, 2 h), 5%脱脂奶粉封闭 80 min 后加入一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST (TBS+0.05% Tween20)洗膜 3 次, 每次 15 min, 然后加入二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min, 然后进行化学发光测定, 显影结果使用 Photoshop 软件进行分析.

### 1.5 统计分析

实验所得数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组之间比较

采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为统计学上有显著差异.

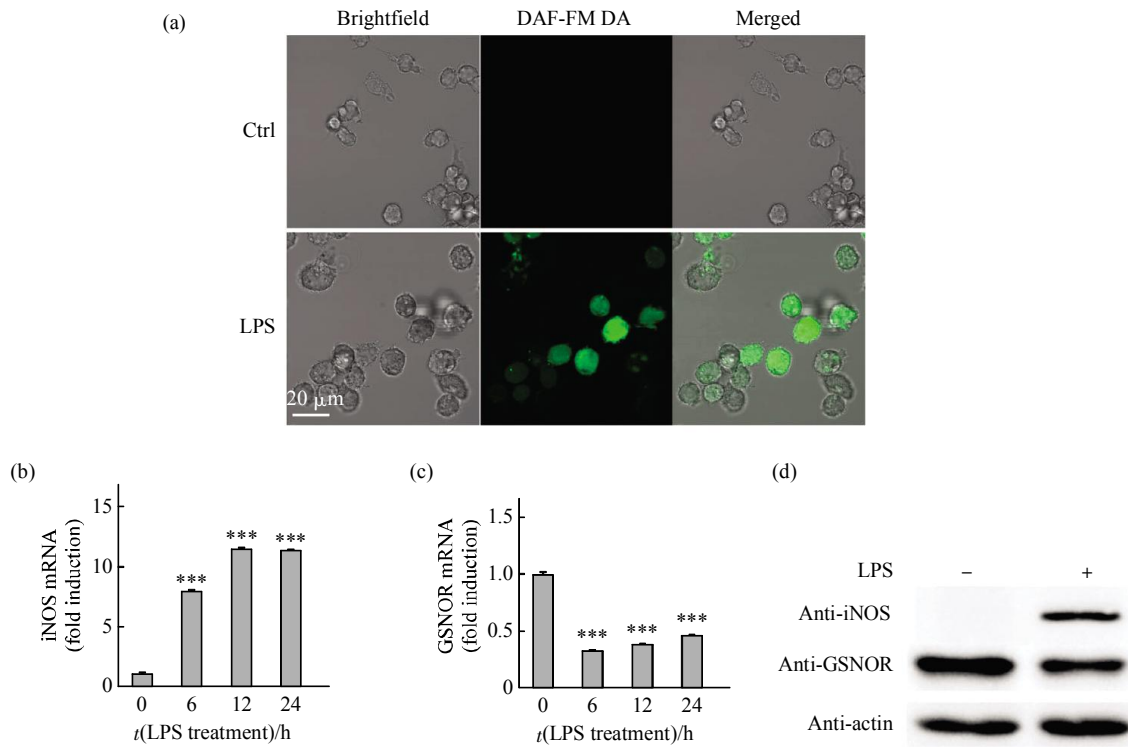
## 2 结 果

### 2.1 在 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应中 GSNOR 的转录和蛋白质表达下调

LPS 等损伤因子的刺激能够激活 RAW264.7 巨噬细胞的炎症反应, 并诱导多种炎症相关因子的产生, 其中 NO 的产生对炎症反应的发生、发展以及免疫细胞的调节都具有重要作用<sup>[15-16]</sup>. 在本实验室先前的研究中已经报道过 LPS/IFN- $\gamma$  刺激 RAW264.7 导致细胞内整体的蛋白亚硝基化水平升高<sup>[17]</sup>. 在本研究中, 我们进一步证明 LPS/IFN- $\gamma$  处理诱导 RAW264.7 中 NO 产生(图 1a), 同时发现 iNOS 的 mRNA 在处理 6 h 显著升高, 并随着处

理时间逐步上调, 在 12 h 达到峰值并至少持续到 24 h(图 1b), 而 GSNOR 的 mRNA 在 6 h 就显著下调, 并且这种下调一直持续到 24 h(图 1c). 进一步的蛋白质免疫印记结果表明, LPS/IFN- $\gamma$  处理 24 h 后, iNOS 的蛋白表达显著增加, 而 GSNOR 的蛋白表达明显降低(图 1d). 这些结果表明,

LPS/IFN- $\gamma$  在 RAW264.7 巨噬细胞中同时调控 iNOS 和 GSNOR 这两个关键的 NO 调控蛋白. 由于 iNOS 是巨噬细胞中主要的 NO 合成酶, 而 GSNOR 是唯一已知的 NO 代谢酶, LPS/IFN- $\gamma$  可能通过同时上调 iNOS 和下调 GSNOR 的协同作用, 最终激活细胞内的 NO 信号通路.



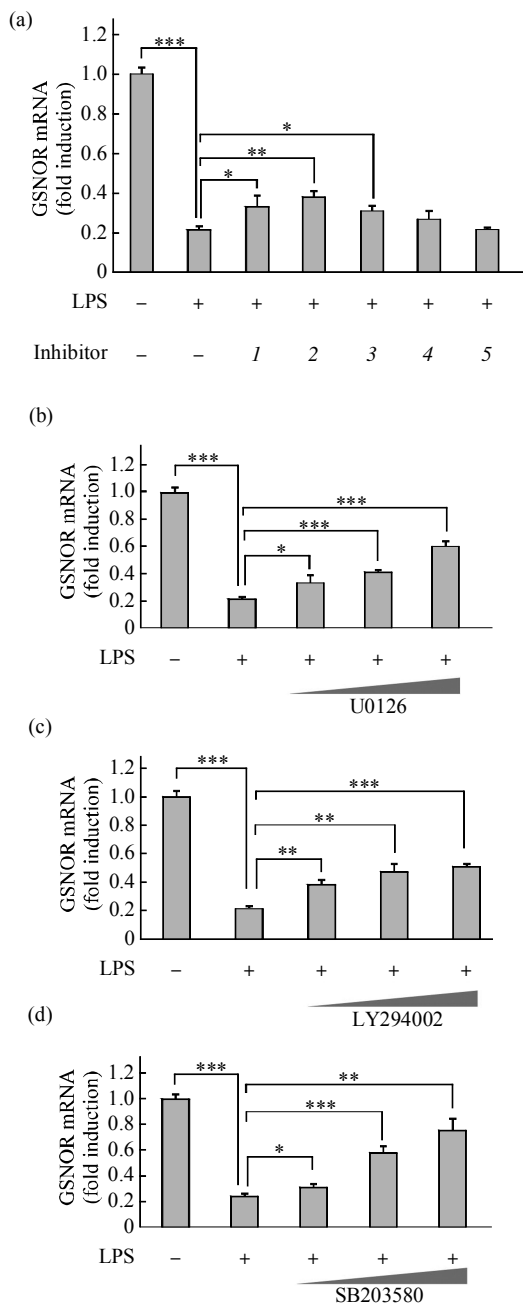
**Fig. 1 GSNOR expression was downregulated by LPS inflammatory stimuli in RAW264.7 cells**

(a) RAW264.7 cells were stimulated with LPS/IFN- $\gamma$  for 24 h, then incubated for 30 min with DAF-FM DA. Cells images were captured using an Olympus FV1000 confocal microscope. (b, c) Time course effects of LPS/IFN- $\gamma$  on iNOS (b) and GSNOR (c) mRNA were quantified by Real-time PCR. (d) Expression of iNOS and GSNOR were detected by immunoblotting after treatment with LPS/IFN- $\gamma$  for 24 h. Actin served as a loading control.  $n = 3$ . Values are expressed as  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.005$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

## 2.2 GSNOR 的转录调控依赖 MAPK 和 PI3K 信号通路

为了探索 LPS 下调 GSNOR 的信号通路, 我们用 MEK1/2、JNK 和 p38 这三个 MAPK 通路以及 PI3K 和 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制剂预处理 RAW264.7, 发现 MEK1/2 的抑制剂 U0126、p38 的抑制剂 SB203580 以及 PI3K 的抑制剂 LY294002 能够部

分挽回 LPS 所诱导的 GSNOR 转录下调(图 2a), 并且这种挽回效果随着抑制剂浓度的增加而增强(图 2b~d), 而 JNK 的抑制剂 sp600125 和 NF- $\kappa$ B 的抑制剂 PTDC 没有挽回效果(图 2a), 这些结果表明, LPS 通过 MEK1/2、p38 以及 PI3K 这些信号通路下调 GSNOR 的转录.



**Fig. 2 MAPK and PI3K pathways mediate the downregulation of GSNOR by LPS in RAW264.7 cells**

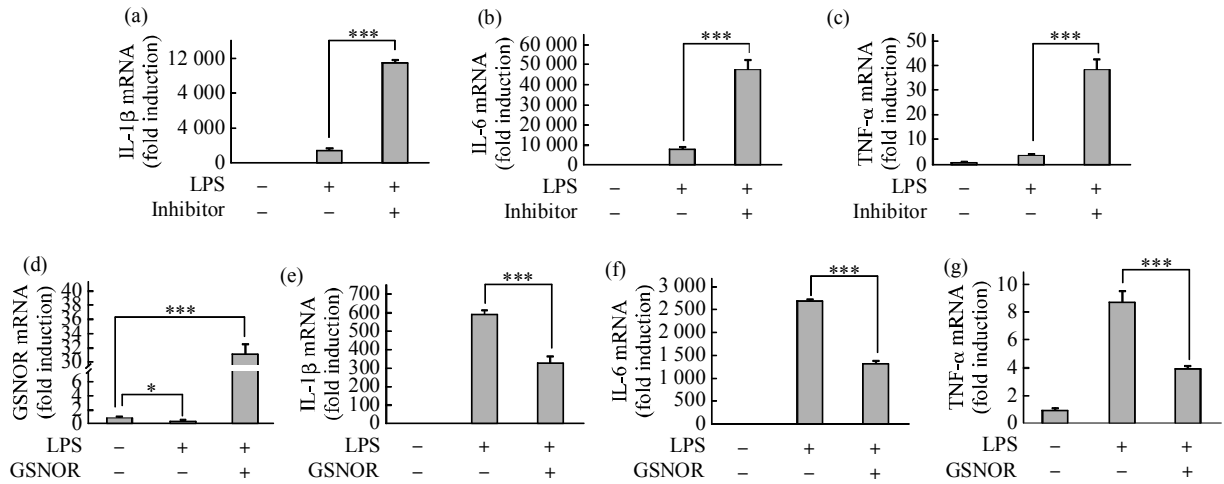
(a) Raw264.7 cells were pre-treated with U0126 (MEK1/2 inhibitor, 20  $\mu\text{mol/L}$ ), LY294002 (PI3K inhibitor, 20  $\mu\text{mol/L}$ ), SB203580 (p38 inhibitor, 20  $\mu\text{mol/L}$ ), sp600125 (JNK inhibitor, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) and PTDC (NF- $\kappa\text{B}$  inhibitor, 100  $\mu\text{mol/L}$ ), respectively, for 30 min before LPS/IFN- $\gamma$  stimulation, then GSNOR mRNA was quantified by Real-time PCR after 6 h. 1: U0126; 2: LY294002; 3: SB203580; 4: sp600125; 5: PTDC. (b ~ d) Dose-dependent effects of U0126, LY294002, or SB203580 on GSNOR mRNA.  $n = 3$ . Values are expressed as  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.005$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

**2.3 GSNOR 在 LPS 诱导的炎症因子表达中的作用**

化合物 C3 能够特异地抑制 GSNOR 的 GSNOR 还原酶活性, 导致细胞内的蛋白质亚硝基化水平上升<sup>[18]</sup>. 为了进一步研究 GSNOR 在炎症反应中的作用, 我们检测了 GSNOR 酶活抑制剂 C3 对炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  转录的影响. 发现与 LPS/IFN- $\gamma$  单独处理相比, GSNOR 抑制剂 C3 预处理 30 min 显著增强了 LPS/IFN- $\gamma$  所诱导的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的转录(图 3a~c). 为了进一步确定 GSNOR 对炎症因子的调控作用, 我们用 GSNOR 的真核表达载体转染 RAW264.7 细胞, 检测到转染细胞中 GSNOR 的 mRNA 水平约是对照组的 34 倍, 而与图 1c 结果一致的是单独 LPS 处理导致 GSNOR 的转录下调(图 3d). 检测表明过表达 GSNOR 抑制了 LPS/IFN- $\gamma$  所诱导的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的转录(图 3e~g). 这些结果说明, 在 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应中, GSNOR 的下调促进炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的转录, 且该作用与 GSNOR 酶活相关.

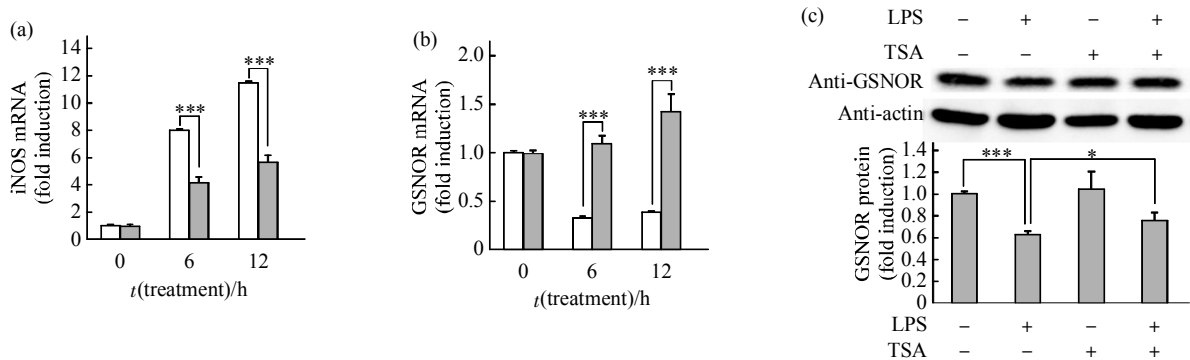
**2.4 抗炎药 TSA 通过抑制 GSNOR 的下调从而抑制炎症因子表达**

曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA)是一个广谱的组蛋白去乙酰化酶抑制剂, 通过增加组蛋白的乙酰化水平调控许多基因的转录和表达<sup>[19]</sup>. 在炎症反应中, TSA 抑制 NO 信号通路, 这与 TSA 的抑制炎症作用密切相关<sup>[20-21]</sup>. 为了探索巨噬细胞炎症模型中 TSA 对体内 NO 信号的调控机制, 我们检测了 TSA 对 iNOS 和 GSNOR 的表达调控, 发现 TSA 处理 6 h 即能显著抑制 LPS 所诱导的 iNOS 的转录上调(图 4a), 有趣的是 LPS 所诱导的 GSNOR 下调也同时被 TSA 所抑制, 并且在 TSA 处理 12 h 后 GSNOR 的转录显著上调 (图 4b). 在蛋白质免疫印记检测中也发现 TSA 部分挽回 LPS 所抑制的 GSNOR 蛋白表达(图 4c). 这些结果表明 TSA 通过下调 iNOS 和上调 GSNOR 共同抑制体内的 NO 信号. 为了进一步研究 GSNOR 是否参与 TSA 对炎症因子的调控作用, 我们检测了 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中 TSA 对炎症因子的转录调控, 发现 TSA 确实抑制了 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的转录, 与此同时预先用 GSNOR 的抑制剂处理能够削弱 TSA 对这两个炎症因子的转录抑制(图 5a, b). 虽然 GSNOR 抑制剂的处理不能够完全挽回 TSA 所抑制的炎症因子转录, 但这种部分挽回表明 GSNOR 确实参与了 TSA 对炎症因子的抑制作用.



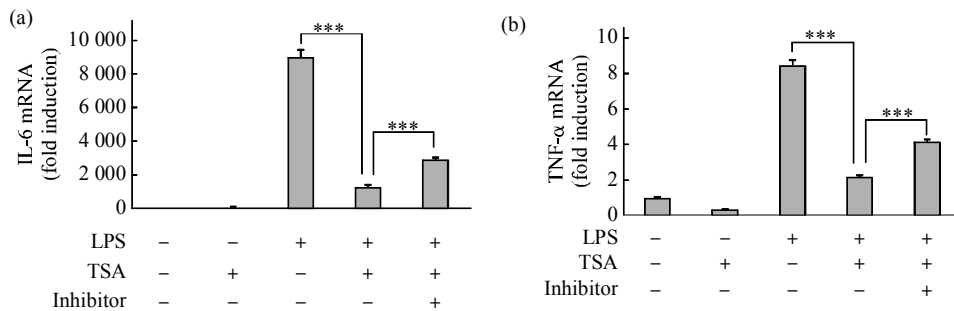
**Fig. 3 GSNOR suppresses cytokine expression induced by LPS in RAW 264.7 cells**

(a~c) Effect of GSNOR inhibitor (33 μmol/L) on the mRNA level of IL-1β, IL-6 and TNF-α after treatment with or without LPS/IFN-γ for 6 h. (d) RAW264.7 cells were transfected with a GSNOR expression vector or vehicle for 48 h, then GSNOR mRNA was quantified by Real-time PCR. (e~g) Cells were transfected with GSNOR expression vector or vehicle for 48 h before LPS/IFN-γ stimulation, then the mRNA levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α were quantified by Real-time PCR after treatment with or without LPS/IFN-γ for 6 h. *n* = 3. Values are expressed as  $\bar{x} \pm s$ . \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.005; \*\*\**P* < 0.001.



**Fig. 4 Rescue of GSNOR by the anti-inflammatory drug trichostatin A (TSA)**

(a, b) RAW 264.7 cells were pre-treated with or without TSA (200 nmol/L) for 20 min and then treated with LPS/IFN-γ for 0, 6 h and 12 h. mRNA levels of iNOS (a) and GSNOR (b) were analyzed by Real-time PCR. □ : LPS; ■ : LPS +TSA. (c) The level of GSNOR was detected by immunoblotting after 24 h treatment. Densitometric analysis of immunoblotting was shown as fold-induction after being normalized to untreated group in bottom panel. Actin served as a loading control. *n* = 3. Values are expressed as  $\bar{x} \pm s$ . \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.005; \*\*\**P* < 0.001.



**Fig. 5 GSNOR is involved in the regulatory effect of TSA on inflammatory cytokines**

(a, b) RAW 264.7 cells were pre-treated with or without GSNOR inhibitor or TSA. mRNA levels of IL-6 (a) and TNF-α (b) were quantified by Real-time PCR after treatment with LPS/IFN-γ for 6 h. *n* = 3. Values are expressed as  $\bar{x} \pm s$ . \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.005; \*\*\**P* < 0.001.

### 3 讨 论

本研究中我们发现, 在 LPS 诱导巨噬细胞 RAW264.7 的炎症反应中, LPS 通过 MEK1/2、p38 和 PI3K 信号通路下调 GSNOR 的表达, 抑制 GSNOR 的酶活促进了 LPS 诱导的炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 以及 TNF- $\alpha$  的表达, 而过表达 GSNOR 则抑制了这些炎症因子的表达, 表明 GSNOR 是一个调控炎症因子表达的新分子. 进一步的研究表明, 炎症抑制药物 TSA 在抑制 LPS 诱导的 iNOS 表达的同时, 抑制 GSNOR 下调. GSNOR 酶活抑制剂的处理削弱了 TSA 对炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的抑制效果, 说明 GSNOR 部分介导了 TSA 的抗炎作用.

#### 3.1 巨噬细胞通过上调 iNOS 和下调 GSNOR 共同增强免疫炎症反应

NO 信号通路受 NOS 和 GSNOR 的双重调控, NOS 合成 NO, 增强体内的 NO 信号, 而 GSNOR 代谢体内的 GSNO, 下调 NO 信号<sup>[11, 13]</sup>. 敲除 GSNOR 破坏了 NO 的内平衡, 导致心脏、血管、呼吸道、肝脏等多个组织和器官中 NO 信号的失调, 影响机体的正常功能<sup>[22-25]</sup>. 这些都表明体内 GSNOR 表达水平对维持正常的 NO 信号具有重要的生理意义. 在本研究中我们发现 LPS 在诱导 iNOS 表达的同时抑制了 GSNOR 的表达, 表明在炎症反应中, 细胞不仅需要通过上调 iNOS 来增加 NO 的合成, 同时需要下调 GSNOR 来减少 NO 的代谢, 两者共同作用上调细胞内的 NO 信号, 从而促进了巨噬细胞的炎症反应. 文献报道在巨噬细胞炎症模型中, 抑制 GSNOR 促进免疫调节分子 HO-1 的表达<sup>[26]</sup>, 而在 LPS 刺激的小鼠模型中, 敲除 GSNOR 导致 NO 水平显著升高, 上调炎症调节因子 S100A9 的表达<sup>[27]</sup>. 与此一致的是, 本研究发现 GSNOR 负调控炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达, 表明与 NO 合酶一样, GSNOR 是一个新的炎症反应调控分子.

#### 3.2 在炎症相关疾病中, 上调 GSNOR 可能是抑制炎症的新思路

已知过度的炎症反应会损伤免疫细胞以及正常组织, 并导致慢性炎症等免疫系统相关疾病. TSA 在炎症反应中调控细胞因子、趋化因子以及相关转录因子表达, 表现出对炎症反应的抑制效应<sup>[28-29]</sup>, 从而应用于内毒素血症、慢性关节炎、白血病以及癌症等慢性炎症和自身免疫疾病的实验性治疗<sup>[30-31]</sup>. 已有的研究表明, TSA 通过抑制 iNOS 的表达发挥

抗炎作用<sup>[31]</sup>. 在本研究中我们发现, TSA 在抑制 iNOS 的同时也挽回了 LPS 介导的 GSNOR 下调, 两者共同作用抑制体内 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达. 这提示我们 TSA 对体内 NO 信号的调控不仅是通过抑制 NO 合成, 还有可能是通过同时增加 NO 的代谢来实现的. 抑制 GSNOR 的酶活削弱了 TSA 对炎症因子的抑制作用, 表明 GSNOR 参与 TSA 对炎症因子的调控. 通过上调 GSNOR 从而抑制炎症因子的表达可能是抑制炎症的新思路.

综上所述, 降低 GSNOR 水平促进炎症反应, 而上调 GSNOR 增强抗炎作用, 表明 GSNOR 是一个新的重要炎症调控分子. GSNOR 可能成为调控 NO 介导的炎症相关信号通路的潜在靶点. 此外, 与以往多关注 NO 合成在炎症反应中作用不同, 本研究从 NO 代谢角度揭示了 GSNOR 直接参与炎症反应调控作用, 拓展了对 NO 在炎症反应中作用机制的认识. NO 合成和代谢双调控应该成为调控 NO 在不同生理病理过程中作用的新策略.

### 参 考 文 献

- [1] Hanana T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cyto Grow Fact Rev*, 2002, **13**(4-5): 413-421
- [2] Schwartsburd P M. Chronic inflammation as inductor of pro-cancer microenvironment: pathogenesis of dysregulated feedback control. *Cancer Metastasis Rev*, 2003, **22**(1): 95-102
- [3] Elenkov I J, Iezzoni D G, Daly A, *et al.* Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. *Neuroimmunomodulation*, 2005, **12**(5): 255-269
- [4] Guzik T J, Korbut R, Adamek-guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2003, **54**(4): 469-487
- [5] Kobayshi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leuko Biol*, 2010, **88**(6): 1157-1162
- [6] Tripathi P. Nitric oxide and immune response. *Indian J Biochem Biophys*, 2007, **44**(5): 310-319
- [7] Siednienko J, Nowak J, Moynagh P N, *et al.* Nitric oxide affects IL-6 expression in human peripheral blood mononuclear cells involving cGMP-dependent modulation of NF-kappa B activity. *Cytokine*, 2011, **54**(3): 282-288
- [8] Hill J R, Corbett J A, Kwon G, *et al.* Nitric oxide regulates interleukin 1 bioactivity released from murine macrophages. *J Biol Chem*, 1996, **271**(37): 22672-22678
- [9] Morita R, Uchiyama T, Hori T. Nitric oxide inhibits IFN-alpha production of human plasmacytoid dendritic cells partly *via* a guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. *J Immunol*, 2005, **175**(2): 806-812
- [10] Connelly L, Palacios-callender M, Ameixa C, *et al.* Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and

- anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol*, 2001, **166**(6): 3873-3881
- [11] Duan S, Chen C. S-nitrosylation/denitrosylation and apoptosis of immune cells. *Cell Mol Immunol*, 2007, **4**(5): 353-358
- [12] Liu L, Hausladen A, Zeng M, *et al.* A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature*, 2001, **410**(6827): 490-494
- [13] Benhar M, Forrester M T, Stamler J S. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, **10**(10): 721-732
- [14] De Groot D, Zangerle P F, Gevaert Y, *et al.* Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine*, 1992, **4**(3): 239-248
- [15] Xie Q W, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric-oxide synthase confers inducibility by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Experi Med*, 1993, **177**(6): 1779-1784
- [16] Coleman J W. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, 2001, **1**(8): 1397-1406
- [17] Zhang X, Huang B, Chen C. SNO spectral counting (SNOSC), a label-free proteomic method for quantification of changes in levels of protein S-nitrosation. *Free Radic Res*, 2012, **46**(8): 1044-1050
- [18] Sanghani P C, Davis W I, Fears S L, *et al.* Kinetic and cellular characterization of novel inhibitors of S-nitrosoglutathione reductase. *J Biol Chem*, 2009, **284**(36): 24354-24362
- [19] Yoshida M, Horinouchi S, Beppu T. Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays*, 1995, **17**(5): 423-430
- [20] Lu S C, Wu H W, Lin Y J, *et al.* The essential role of Oct-2 in LPS-induced expression of iNOS in RAW 264.7 macrophages and its regulation by trichostatin A. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2009, **296**(5): C1133-C1139
- [21] Han S B, Lee J K. Anti-inflammatory effect of trichostatin-A on murine bone marrow-derived macrophages. *Arch Pharm Res*, 2009, **32**(4): 613-624
- [22] Liu L, Yan Y, Zeng M, *et al.* Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell*, 2004, **116**(4): 617-628
- [23] Beigi F, Gonzalez D R, Minhas K M, *et al.* Dynamic denitrosylation via S-nitrosoglutathione reductase regulates cardiovascular function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(11): 4314-4319
- [24] Que L G, Liu L, Yan Y, *et al.* Protection from experimental asthma by an endogenous bronchodilator. *Science*, 2005, **308**(5728): 1618-1621
- [25] Tang C H, Wei W, Hanes M A, *et al.* Increased hepato carcinogenesis from GSNOR deficiency in mice is prevented by pharmacological inhibition of iNOS. *Cancer Research*, 2013, **73**(9): 2897-2904
- [26] Foster M W, Yang Z H, Gooden D M, *et al.* Proteomic characterization of the cellular response to nitrosative stress mediated by S-nitrosoglutathione reductase inhibition. *J Prot Res*, 2012, **11**(4): 2480-2491
- [27] Ozawa K, Tsumoto H, Wei W, *et al.* Proteomic analysis of the role of S-nitrosoglutathione reductase in lipopolysaccharide-challenged mice. *Proteomics*, 2012, **12**(12): 2024-2035
- [28] Majumdar G, Adris P, Bhargava N, *et al.* Pan-histone deacetylase inhibitors regulate signaling pathways involved in proliferative and pro-inflammatory mechanisms in H9c2 cells. *BMC Genomics*, 2012, **13**(1): 709
- [29] Yu Z, Zhang W, Kone B C. Histone deacetylases augment cytokine induction of the iNOS gene. *J Am Soc Nephrol*, 2002, **13**(8): 2009-2017
- [30] Suzuki T, Miyata N. Non-hydroxamate histone deacetylase inhibitors. *Curr Med Chem*, 2005, **12**(24): 2867-2880
- [31] Vanhaecke T, Papeleu P, Elaut G, *et al.* Trichostatin A - like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view. *Curr Med Chem*, 2004, **11**(12): 1629-1643

## GSNOR: a Novel Regulator of Inflammation\*

WU Kai-Yuan<sup>1,2\*\*</sup>, ZHANG Yu-Ying<sup>1,2\*\*</sup>, SU Wen-Ting<sup>1</sup>, CHEN Chang<sup>1,2\*\*\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;*

<sup>2</sup>*University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)*

**Abstract** Regulation of inflammatory cytokines is a critical stage in inflammation, an important factor in autoimmune disease and cancer. Nitric oxide (NO) is known to be an important regulator of inflammatory cytokines, however, most existing studies focus on the role of NO synthesis in the regulation of inflammatory cytokines, and little is known about the role of NO metabolism. Since S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) is a key protein in the control of NO metabolism, investigating its role in inflammation will be important for understanding the role of NO metabolism. Here we found that GSNOR transcription and protein expression is downregulated by lipopolysaccharide (LPS) in RAW264.7 cells, an inflammatory cell model. Inhibitors of MEK1/2, p38 and PI3K significantly attenuate the decrease in GSNOR transcription. Furthermore, inhibition of the enzyme activity of GSNOR promoted expression of LPS-induced inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , whereas overexpression of GSNOR had the opposite effect. The anti-inflammatory drug trichostatin A (TSA) rescued the downregulation of GSNOR expression by LPS. Furthermore, inhibition of GSNOR impaired the anti-inflammatory effect of TSA by increasing the expression of IL-6 and TNF- $\alpha$ . In conclusion, our work reveals a new mechanism used by macrophage cells to enhance the inflammatory response by simultaneously upregulating inducible nitric oxide synthase (iNOS) and downregulating GSNOR, thus expanding our understanding of NO metabolism in inflammatory responses. This study shows that GSNOR is a novel regulator of inflammation and may be a potential target for the regulation of NO-mediated inflammation.

**Key words** GSNOR, LPS, inflammatory cytokines, NO

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00131

---

\*This work was supported by grants from The National Basic Research Program of China (2012CB911000, 2011CB503900) and The National Natural Sciences Foundation of China (31030023).

\*\*These authors contributed equally to this work.

\*\*\*Corresponding author.

Tel: 86-10-64888406, E-mail: changchen@moon.ibp.ac.cn

Received: April 18, 2013 Accepted: May 24, 2013