La doxiciclina induce, nella linea macrofagica J774, apoptosi in maniera NO-indipendente

E. Cillari, F. Arcoleo, P. D'Agostino*

Azienda Ospedaliera "V. Cervello" Laboratorio di Patologia Clinica;
**Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale,*
Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico "P. Giaccone", Palermo

Premessa: In questo studio *in vitro* sono stati studiati gli effetti della doxiciclina sulla produzione di ossido di azoto (NO) nella linea cellulare J774 stimolata con lipopolisaccaride (LPS). Inoltre è stato valutato se questo farmaco era capace di modificare, sempre sulle stesse cellule J774, la vitalità cellulare.
Metodi: I macrofagi della linea J774 erano stimolati con LPS (100 ng/ml) e con doxiciclina (5, 50, 100 μM). L'NO prodotto dalle cellule macrofagiche e presente nei sopranatanti sotto forma di nitriti veniva dosato mediante la reazione di Griess. La vitalità cellulare era valutata mediante un metodo colorimetrico che si basa sulla riduzione dei sali di tetrazolio in sali di formazano. L'apoptosi era indagata sia con la microscopia a fluorescenza dopo colorazione della linea J774 con arancio di acridina e bromuro di etidio, sia mediante l'individuazione dei frammenti di cromatina con la tecnica TUNEL.
Risultati: E' stato dimostrato che la doxiciclina riduce, in maniera dose-dipendente, la sintesi di NO e presenta la capacità di diminuire la vitalità delle cellule J774 attraverso la induzione di morte cellulare programmata o apoptosi. Gli effetti citotossici erano presenti anche se la produzione di NO era significativamente ridotta dalla doxiciclina.
Conclusioni: Questi risultati indicano che la doxiciclina è in grado di esercitare effetti anti-infiammatori inibendo la produzione di ossido di azoto. Inoltre è capace di modificare la vitalità cellulare inducendo morte cellulare apoptotica che sembra essere indotta da meccanismi diversi da quelli indotti da NO.

Background:*Doxycycline induces apoptosis in J774 cell line via a NO-independent way.*
In this *in vitro* study it has been investigated the effects of doxycycline on nitric oxide (NO) production by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated J774 cell line. Furthermore, it has been evaluated the ability of this drug to modify the cell viability in the J774 cells.
Methods: J774 macrophages were stimulated with LPS (100 ng/ml) and doxycycline (5, 50, 100 μM). In the culture supernatants NO synthesis, evaluated as nitrite, was determined by Griess reaction. Cell viability was detected by colorimetric method that employed the reduction of tetrazolium salt to formazan. Apoptosis was evaluated both by fluorescence microscope staining J774 cells with acridine orange and ethidium bromide and identifying DNA breaks by TUNEL technique.
Results: It has been demonstrated that doxycycline reduces NO synthesis and is able to decrease, in a dose-dependent manner, the viability in J774 cells by inducing programmed cell death or apoptosis. Even though, NO production was significantly reduced in the presence of doxycycline, cytotoxic effects in J774 macrophages were observed.
Conclusions: These results indicate that doxycycline is able to exert anti-inflammatory effects by inhibiting nitric oxide production. Furthermore, it is capable to modify cell viability by inducing apoptotic cell death in a NO-independent way.

Introduzione

E' generalmente accettato che la morte cellulare può essere la conseguenza di un processo degenerativo passivo oppure di un fenomeno attivo. Il primo tipo di morte cellulare è definita necrosi, la seconda modalità morte cellulare programmata o apoptosi[1]. La necrosi rappresenta la risposta passiva ad un danno di notevole entità ed è caratterizzata dalla perdita di integrità della membrana plasmatica con riversa-

Corrispondenza a: Dott. Pietro D'Agostino - Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale - Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico "P. Giaccone" - Via Del Vespro n° 127, 90134, Palermo - c/o Via Strada Ferrata n° 12, 90046 Monreale (Palermo) - Tel. 091-6553222; Fax: 091-6553223 - e-mail:pietrodag@tin.it

mento del contenuto citosolico e degli organuli nell'ambiente circostante e a causa di ciò viene ad essere attivata una risposta flogistica[1]. L'apoptosi, processo che si verifica normalmente sia durante l'embriogenesi sia durante tutto l'arco della vita, è un tipo di morte cellulare che prosegue per tappe ordinate ed è caratterizzata da tipici cambiamenti morfologici[2]. Infatti la cellula pur mantenendo l'integrità della membrana cellulare si raggrinza e si formano caratteristiche protrusioni plasmatiche, la cromatina nucleare si condensa e il DNA genomico viene degradato. Alla fine del processo si ha la formazione dei cosiddetti "corpi apoptotici" che vengono fagocitati senza che sia elicitata una risposta infiammatoria[3, 4].

La morte cellulare programmata può essere indotta da svariati fattori sia esogeni sia endogeni. Tra gli agenti endogeni capaci di indurre apoptosi un posto preminente occupa l'ossido di azoto (NO)[5]. L'NO deriva dall'ossidazione dell'azoto terminale della arginina ad opera di un enzima, l'ossido di azoto sintetasi (NOS)[6]. L'NO è una molecola pleiotropica che, oltre a svolgere un preminente ruolo nella neurotrasmissione, nella regolazione del tono vascolare, nella infiammazione acuta e cronica è responsabile, anche, di effetti citotossici e, in particolare, è determinante nella regolazione della morte cellulare programmata[7]. Dipendendo dal tipo cellulare e dalle specifiche condizioni l'NO può agire o da induttore o da inibitore dell'apoptosi[8]. Generalmente basse concentrazioni di NO proteggono dalla apoptosi, al contrario alti livelli hanno azione pro-apoptotica[5].

Diversi studi hanno definitivamente dimostrato che antibiotici appartenenti alla famiglia delle tetracicline possiedono proprietà anti-flogistiche, funzioni biologiche del tutto indipendenti dalle loro attività antibatteriche[9]. Gli effetti anti-infiammatori di questi farmaci si possono riassumere nella capacità di inibire le metallo-proteasi tissutali (MPPs)[9], di modulare le cellule infiammatorie (inibizione della migrazione e degranulazione dei neutrofili)[10, 11] e diversi mediatori della flogosi (sintesi di radicali dell'ossigeno, di acido arachidonico, di prostaglandina E_2)[10, 12, 13]. Inoltre, recentemente è stato dimostrato che le tetracicline sono in grado di inibire la sintesi di NO e la produzione di citochine pro-infiammatorie[14-16]. Infine è stato riportato che le tetracicline inibiscono la proliferazione cellulare e presentano effetti citotossici diretti su cellule neoplastiche[17].

Alte concentrazioni di NO indurrebbero, sulle stesse cellule che sintetizzano NO, effetti citotossici che sono causati principalmente dall'induzione dell'apoptosi[18]. Poiché la doxiciclina, derivato semisintetico della tetraciclina, è una molecola con una forte attività inibitrice sulla sintesi di NO[14, 16], in questo studio si sono investigati gli effetti di questo farmaco sia sulla vitalità cellulare della linea macrofagica J774 sia sull'induzione di meccanismi apoptotici.

Metodi

Reagenti

Il lipopolisaccaride (LPS, da *Escherichia coli* sierotipo O26:B6), 3,4,5-dimetiltiazolio-2yl-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) e la doxiciclina erano forniti dalla ditta Sigma (Poole, Dorset, U.K.). La doxiciclina era disciolta in tampone fosfato-salino e diluita nelle appropriate concentrazioni sperimentali in terreno di coltura completo. Il terreno di coltura tissutale era costituito da RPMI-1640 (TechGen International, Les Ulis, Francia) a cui venivano aggiunti glutamina (2 mM), antibiotici (penicillina e streptomicina), HEPES e siero fetale bovino (FCS: Seromed, Biochrom KG, Berlino, Germania). Le piastre per le colture tissutali erano della ditta NUNC (Roskilde, Danimarca).

Colture cellulari

La linea cellulare macrofagica murina J774, impiegata per il nostro studio sperimentale, era ottenuta dalla American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Le cellule erano mantenute in terreno di coltura completo (RPMI al 10% di FCS).

Induzione e determinazione della sintesi di NO

Le cellule J774 ($1x10^6$/ml) erano coltivate per 2 h a 37°C in piastre a 24 pozzetti in RPMI al 2% di FCS. Dopo tale intervallo si eseguivano tre lavaggi per rimuovere le cellule non aderenti e a quelle aderenti venivano aggiunte le sostanze (LPS: 100 ng/ml; doxiciclina: 5, 50, 100 μM) e coltivate per vari periodi (24 – 48 – 72 h) a 37°C al 5% di CO_2. LPS è stato utilizzato alla dose di 100 ng/ml in quanto in esperimenti di titolazione si è dimostrato che tale concentrazione era efficace ad indurre una produzione ottimale di NO determinando scarsi effetti citotossici. Al termine dei periodi di incubazione i sopranatanti delle colture cellulari venivano raccolti e in essi veniva determinata la concentrazione di NO (valutato come NO_2^-) mediante la reazione di Griess[14].

Valutazione della vitalità cellulare e dell'apoptosi

Per determinare gli effetti della doxiciclina sulla vitalità della linea macrofagica J774 era impiegato il metodo colorimetrico di Mosmann modificato[19]. Questo metodo si basa sulla riduzione, nelle cellule vitali, dei sali di tetrazolio (MTT) in un prodotto di colore blu (sali di formazano) ad opera dell'enzima mitocondriale succinato-deidrogenasi. Le cellule J774 ($1x10^6$/ml), depositate in piastre a 96 pozzetti, erano incubate per 24 h a 37°C con LPS (100 ng/ml) in presenza o meno di doxiciclina (5, 50, 100 μM). Dopo il periodo di incubazione il sopranatante veniva eliminato, ai pozzetti venivano aggiunti 100 μl del reagente MTT (0,2 mg/ml) e le piastre re-incubate a 37°C per altre 2 h. Dopo avere aspirato il reagente MTT, alle colture erano, poi, aggiunti 100 μl

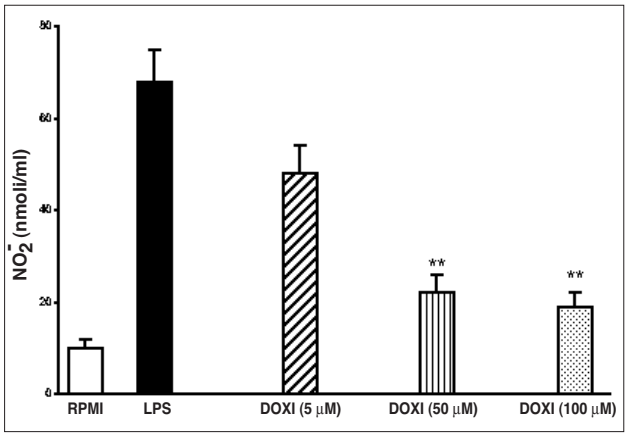
di DMSO per determinare la rottura delle membrane. L'assorbanza, infine, era misurata mediante uno spettrofotometro ELISA alla lunghezza d'onda di 595 nm. L'apoptosi era valutata, al microscopio a fluorescenza, dopo colorazione dei macrofagi J774 con una miscela di arancio di acridina e bromuro di etidio. Le cellule apoptotiche erano identificate sia dalla condensazione e dalla frammentazione della cromatina nucleare sia dalla formazione dei corpi apoptotici. Inoltre per valutare la morte cellulare programmata era impiegata anche la tecnica TUNEL (TdT-FraEL DNA Fragmentation detection kit, Calbiochem, Cambridge, MA, USA) il cui metodo si basa sulla colorazione dei frammenti della cromatina nucleare evidenziando i nuclei delle cellule apoptotiche.

Analisi statistica
Tutti gli esperimenti erano eseguiti 3 o 4 volte ed i risultati espressi come media ± errore standard (ES). In ciascun esperimento la ES era entro il 10%. La significatività era valutata mediante il *t*-test di Student mediante analisi della varianza (Student-Newmann-Keuls test); la P<0,01 era considerata statisticamente significativa.

Risultati

Effetti della doxiciclina sulla sintesi di NO
Come mostrato in figura 1, la doxiciclina (5, 50, 100 μM) è capace di modulare la produzione di NO nelle colture cellulari J774 stimolate con LPS (100 ng/ml) per 24 h, riducendo significativamente la sintesi di NO (valutato come NO_2^-) in maniera dose-dipendente. Infatti, la doxiciclina determina, già a partire dalla concentrazione più bassa, una lieve riduzione della sintesi di NO che diventa significativa (P<0,01) quando viene utilizzata la concentrazione di 50 μM (Figura 1). Dosi più elevate di questo farmaco (100 μM) determinano, seppure marginalmente, una ulteriore riduzione della produzione di NO (Figura 1). Risultati simili sono stati evidenziati nei sopranatanti delle cellule macrofagiche J774 coltivate per 48 e 72 h (dati non mostrati).

Figura 1. Effetti della doxiciclina sulla produzione di NO. I macrofagi murini J774 (1x10⁶/ml) erano stimolati con LPS (100 ng/ml) in presenza di differenti concentrazioni di doxiciclina (5, 50, 100 μM) e incubati per 24 h. Le concentrazioni di NO sono valutate come nmoli di NO_2^-/ml. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti ed espressi come media ± E.S. **P<0,01: inibizione significativa rispetto alle cellule trattate con solo LPS. (LPS: lipopolisaccaride; Doxi: doxiciclina; NO: ossido di azoto).



Effetti della doxiciclina sulla vitalità delle cellule J774
L'analisi della vitalità cellulare, valutata con il metodo colorimetrico di riduzione dei sali di tetrazolio in sali di formazano, dimostra che la doxiciclina non è in grado di determinare modificazioni della vitalità cellulare nei macrofagi J774. Come mostrato in Tabella I, le cellule J774 poste in coltura con le diverse dosi di doxiciclina non presentano una significativa riduzione della vitalità rispetto alle cellule controllo. Al contrario, la stimolazione con LPS provoca nei macrofagi significativi effetti citotossici (P<0,01). L'aggiunta di doxiciclina nelle cellule stimolate con LPS era inefficace nel determinare ulteriori modificazioni della vitalità cellulare rispetto alle colture trattate con LPS (Tabella I). Tutti i dati venivano confermati dalla conta cellulare con il colorante vitale trypan bleu (dati non mostrati).

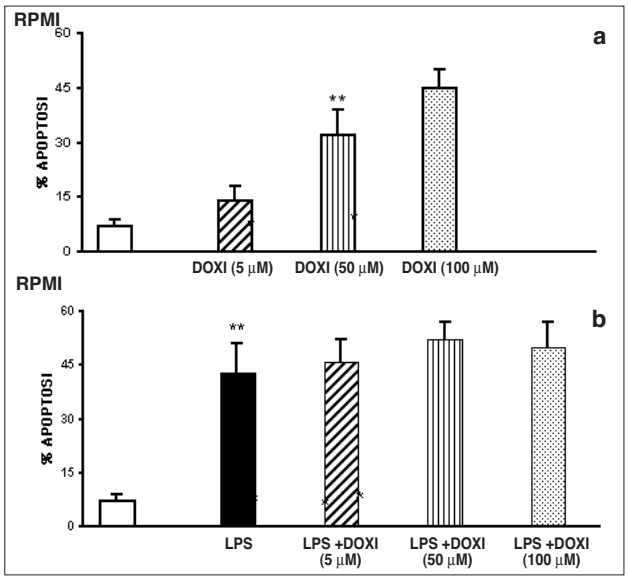
Tabella I. Effetti della doxiciclina sulla vitalità della linea macrofagica J774 valutata mediante il metodo di riduzione allo MTT

	Doxiciclina		
	(5 μM)	(50 μM)	(100 μM)
Doxiciclina (-)	0,920±0,08	0,890±0,09	0,820±0,10
Doxiciclina (+)	0,730±0.04	0,635±0,07	0,550±0,09

La linea cellulare J774 (1x10⁶/ml) era coltivata in RPMI al 2% FCS con varie concentrazioni di doxiciclina in assenza (-) o in presenza (+) di LPS (100 ng/ml) e incubata per 24 h; (RPMI: 0,970±0,07; LPS: 0,620±0,05). La vitalità è espressa come media della densità ottica ± E.S. di sei pozzetti da tre indipendenti esperimenti. (MTT: 3,4,5-dimetiltiazolio-2yl-2,5-difeniltetrazolio bromuro ; LPS: lipopolisaccaride).

Effetti della doxiciclina sulla induzione di apoptosi nella linea macrofagica J774
La figura 2 mostra gli effetti della doxiciclina (5, 50, 100 μM) sulla induzione dell'apoptosi nelle cellule J774. L'analisi delle caratteristiche modificazioni nucleari impiegando la tecnica TUNEL evidenzia che la doxiciclina è capace di indurre, in maniera dose-dipendente, morte cellulare programmata (Figura 2a). Il farmaco è efficace già alla dose di 5 μM ma presenta significativi effetti apoptotici (P<0,01) quando viene impiegato alle concentrazioni maggiori (50 e 100 μM).
Successivamente è stata valutata l'apoptosi nelle colture cellulari stimolate con LPS (100 ng/ml) in presenza di doxiciclina (5, 50, 100 μM). Infatti i macrofagi J774 stimolati con LPS sintetizzano si-

Figura 2. Effetti della doxiciclina sulla apoptosi in cellule J774. Le cellule erano stimolate con varie concentrazioni di doxiciclina (5, 50, 100 μM) in assenza (**a**) o in presenza (**b**) di LPS (100 ng/ml) e incubate per 24 h. La percentuale delle cellule apoptotiche era valutata al microscopio ottico impiegando il metodo TUNEL. **P<0,01: differenza significativa rispetto alle cellule trattate con solo RPMI (colonna bianca). (LPS: lipopolisaccaride; Doxi: doxiciclina).



gnificativi livelli di NO che ad alte concentrazioni è citotossico sulle stesse cellule produttrici. La figura 2b mostra che la doxiciclina, nonostante determini una riduzione della sintesi di NO, induce un ulteriore, anche se lieve, aumento di apoptosi rispetto alle cellule stimolate con solo LPS. Questi risultati erano confermati dallo studio degli aspetti morfologici cellulari, impiegando la colorazione con arancio di acridina e bromuro di etidio (dati non mostrati).

Discussione

In questo studio è stato dimostrato che la doxiciclina è in grado di determinare, in cellule della linea macrofagica J774, significativi effetti citotossici dovuti principalmente alla attivazione del processo di morte cellulare programmata. E' stato descritto che alte concentrazioni di NO sono responsabili di effetti citotossici mediati principalmente attraverso l'induzione di apoptosi[5, 8]. Dal nostro studio emerge che la citotossicità mediata dalla doxiciclina sembra operare attraverso meccanismi diversi da quelli indotti da NO, poiché la doxiciclina è in grado di indurre morte apoptotica nelle cellule J774 anche in assenza di stimolazione con LPS. Gli effetti citotossici NO-indipendenti della doxiciclina erano confermati da esperimenti in cui il farmaco, nonostante avesse la capacità di ridurre significativamente la sintesi di NO nelle cellule stimolate con LPS, determinava nelle stesse colture un aumento di apoptosi.
Dai nostri esperimenti emerge una discordanza tra i dati della vitalità cellulare, ottenuti con il metodo allo MTT, e quelli derivanti dalle tecniche indaganti il processo apoptotico. Questa discrepanza può trovare spiegazione nel fatto che la cellula apoptotica, almeno nelle prime fasi del processo di morte cellulare programmata, mantiene integri gli apparati energetici e gli organuli cellulari, in particolare, i mitocondri[20] e, quindi, essere ancora in grado di ridurre i sali di tetrazolio nel test di Mosmann modificato.
E' generalmente riconosciuto che l'NO ha un ruolo chiave nel processo infiammatorio[21]. Infatti è stato dimostrato che questo mediatore, oltre a presentare effetti citotossici diretti[18] ed indiretti[5] (questi ultimi mediati, almeno in parte, attraverso l'attivazione dei meccanismi dell'apoptosi), amplifica la flogosi inducendo da una parte la sintesi di mediatori ad attività pro-infiammatoria[22] e, dall'altra parte, determinando una inibizione della produzione di citochine ad azione anti-flogistica[22, 23].
Gli effetti inibitori delle molecole appartenenti alla famiglia delle tetracicline e, in particolare, della doxiciclina sulla produzione di NO e sulla sintesi di citochine pro-flogistiche[14-16], insieme ai potenti effetti di ridurre l'attività delle metallo-proteasi della matrice extracellulare[9], forniscono una spiegazione delle spiccate proprietà anti-infiammatorie di questi farmaci[14-16]. Inoltre, la capacità della doxiciclina a determinare effetti citotossici, rappresentati principalmente dalla induzione di apoptosi[17], potrebbe offrire a tale composto interessanti applicazioni in campo terapeutico. Sulla base di queste azioni la doxiciclina potrebbe essere impiegata, in aggiunta ad altri presidi terapeutici, nel trattamento di quelle condizioni pato-fisiologiche in cui è ampiamente dimostrato un coinvolgimento dei mediatori pro-infiammatori solubili e cellulari.
Sono necessari ulteriori studi per approfondire i meccanismi molecolari attraverso cui la doxiciclina esercita i suoi effetti anti-infiammatori e, in particolare, identificare su quali "pathways" cellulari questa molecola agisce nell'induzione del processo apoptotico.

Bibliografia

1. Maino G, Joris J. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol 1995; 146: 3-16.
2. Kerr JFR, Willie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-57.
3. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 1995; 267: 1445-9.
4. Vaux DL. Immunopathology of apoptosis – introduction and overview. Springer Semin Immunopathol 1998; 19: 271-85.
5. Albina JE, Cui S, Mateo RB, Reichner JS. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. J Immunol 1993; 150: 5080-5.
6. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med. 1993; 329: 2002-13.
7. Kröncke KD, Brenner HH, Rodriguez ML, Etzkorn K, Noack EA, Kolb H, et al. Pancreatic islet cells are highly susceptible towards the cytotoxic effects of

chemically generated nitric oxide. Biochim Biophys Acta 1993; 182: 221-9.
8. Kröncke K-D, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection – how, why, when, and where? Nitric Oxide 1997; 2: 107-20.
9. Golub LM, McManara TF, D'Angelo G, Greenwald RA, Ramamurthy NS. A non-antibacterial chemically modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. J Dent Res 1987; 66: 1310-4.
10. Gabler WL, Creamer HR. Suppression of human neutrophil functions by tetracyclines. J Periodont Res 1991; 26: 52-8.
11. Kloppenburg M, Verwell CL, Miltenburg AMM, Verhoeven AJ, Daha MR, Dijkmans BAC, et al. The influence of tetracycline on T cell activation. Clin Exp Immunol 1995; 102: 635-41.
12. Vadas P, Greenwald RA, Street RT, Pruzanki W. Inhibition of synovial fluid phospholipase A2 activity by two tetracicline derivatives, minocycline and doxycycline. Arthritis Rheum 1991; 34: 160-4.
13. El Attar TMA, Lin HS, Schultz R. Effect of minocycline on prostaglandin formation in gingival fibroblast. J Periodont Res 1988; 23: 285-6.
14. Milano S, Arcoleo F, D'Agostino P, Cillari E. Intraperitoneal injection of tetracyclines protect mice from lethal endotoxemia down-regulating inducible nitric oxide synthase in various organs and cytokines and nitrate secretion in the blood. Antimicrob Agents Chemoth 1997; 41: 117-21.
15. D'Agostino P, La Rosa M, Barbera C, Arcoleo F, Di Bella G, Milano S, et al. Doxycycline reduces mortality to lethal endotoxemia by reducing nitric oxide synthesis via an interleukin-10-independent mechanism. J Infect Dis 1998; 177: 489-92.
16. D'Agostino P, Arcoleo F, Barbera C, Di Bella G, La Rosa M, Misiano G, et al. Tetracicline inhibits the nitric oxide synthase activity induced by endotoxin in cultured murine macrophages. Eur J Pharmacol 1998; 346: 283-90.
17. Fife RS, Sledge Jr GW. Effects of doxycycline on cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Adv Dent Res 1998; 12: 94-6.
18. Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator? Immunol Today 1998; 19: 556-61.
19. D'Agostino P, Ferlazzo V, Milano S, La Rosa M, Di Bella G, Caruso R, et al. Anti-inflammatory effects of chemically modified tetracyclines by the inhibition of nitric oxide and interleukin-12 synthesis in J774 cell line. International Immunopharmacology 2001; 1: 1765-76.
20. Kroemer G, Zamzani N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. Immunol Today 1997; 18: 44-50.
21. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 2046-50.
22. Ialenti A, Ianaro A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. Eur J Pharmacol 1992; 211: 177-82.
23. MacMicking J, Xie Q-W, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol 1997; 15: 323-50.