

巨噬细胞 IL-1 β mRNA在高温和 内毒素复合影响下的表达

赵丽瑛, 罗炳德*, 张巍巍

(南方医科大学高温医学研究室, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 研究高温和内毒素 (LPS) 双重因素对巨噬细胞 IL-1 β mRNA表达的影响。方法 采用体外培养的巨噬细胞系 RAW264.7 细胞, 分为常温 (37℃) 对照组, 高温 (40℃) 对照组, 37℃ + LPS组, 38℃ + LPS组, 39℃ + LPS组和 40℃ + LPS组。在含 95% O₂ 和 5% CO₂ 条件下培养 1、2、3 h后, TRIZOL提取细胞总 RNA, 核酸蛋白分析仪检测 RNA的浓度和纯度, 琼脂糖凝胶电泳分析 RNA的完整性, RT-PCR方法检测巨噬细胞 IL-1 β mRNA的表达。结果 在提取的总 RNA无降解、无蛋白质污染的前提下, 温度升高和内毒素都能引起 IL-1 β mRNA表达上调, 内毒素在 38℃时对 IL-1 β mRNA表达的上调作用最大, 但高温和内毒素复合影响可下调 RAW264.7 细胞 IL-1 β mRNA表达。结论 单纯的高温或内毒素均能上调 RAW264.7 细胞 IL-1 β mRNA表达, 但高温复合内毒素却下调 IL-1 β mRNA表达。

关键词: 高温; 内毒素; 巨噬细胞; IL-1 β mRNA表达

中图分类号: R594.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2008)01-0007-03

Effect of high temperature combined with endotoxin on the expression of IL-1 β mRNA in macrophages

ZHAO Liying, LUO Bingde*, ZHANG Weiwei

(Department of Thermal Environment Medicine, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of high temperature combined with endotoxin on the expression of IL-1 β mRNA in macrophages. **Methods** The cultured RAW264.7 macrophagic system in vitro was divided into different experimental groups: normal temperature (37℃) control group, high temperature (40℃) control group, 37℃ + LPS group, the 38℃ + LPS group and the 39℃ + LPS group. After one, two or three hour culture under the condition of 95% O₂ and 5% CO₂, extracting the RNA of the cells with TRIZOL and checking its concentration and purity with nucleic acid protein analyzer; then analyzing the integrity of RNA by agarose gel electrophoresis and checking the expression of IL-1 β mRNA in macrophages by RT-PCR. **Results** The experimental condition of all amount of the extracted RNA was not degraded and not polluted by proteins both high temperature and endotoxin could induce IL-1 β mRNA expression up-regulated and the best effect of endotoxin to up-regulate IL-1 β mRNA expression is at 38℃; but high temperature combined with endotoxin could make RAW264.7 cell IL-1 β mRNA expression down-regulated. **Conclusion** The results showed that high temperature or endotoxin can cause RAW264.7 cell IL-1 β mRNA expression up-regulated but the combined of high temperature and endotoxin would down-regulate IL-1 β mRNA expression.

Key words: High temperature; Endotoxin; Macrophage; IL-1 β mRNA expression

中暑是环境高温和或剧烈体力活动时, 因热的作用而引起的一组急性热致疾病。Shapiro及 Gathiram 等研究表明, 内毒素在中暑的发病机制中起着重要作用。IL-1 是主要的内源性致热原之一, 与中暑的发生关系密切, 巨噬细胞则是 IL-1 的主要来源之一。本实验旨在探讨高温和内毒素双重因素对巨噬细胞 IL-1 β mRNA 表达的影响, 以期进一步探讨中暑内毒素血症的发生机制。

1 材料与方法

1.1 材料

RAW264.7 细胞为小鼠来源的巨噬细胞系, 用 RPMI1640 完全培养基 (含 10% 灭活小牛血清、100 μ g/m 青霉素和 100 μ g/m 链霉素, pH 7.1~7.2) 传代培养。细菌内毒素 (LPS 美国 Sigma 公司), 用 RPMI1640 配成 100 μ g/m 的储存液置于 -70℃ 冰箱保存, 临用前稀释成 20 μ g/m 的工作液。RPMI 1640 (美 Gibco 公司生产 Cat No 31800-022, Lot No 1120708), 按说明书配成所需溶液。小牛血清 (杭州四季青公司生产), 灭活后分装, 于 -20℃ 保存。胰酶 (上海生工, AMRESCO 分装, Lot No 0182197), 用 D-hank's 液配成 0.25% 溶液, 4℃ 冰箱保

收稿日期: 2007-08-22 修回日期: 2007-11-19

基金项目: 广东省自然科学基金 (编号: 5004774)

作者简介: 赵丽瑛 (1985-), 女, 本硕博连读生, 研究方向: 发热的病理生理学。

* 通讯作者

存, One-Step RT-PCR kit (大连宝生生物有限责任公司), 引物 (上海博亚生物技术有限公司合成并经 HPLC 纯化)。

1.2 方法

1.2.1 RAW264.7 细胞培养 用完全培养基传代培养。实验时用 0.25% 胰酶消化细胞后收集细胞, 细胞浓度调制为 1×10^6 g/ml 分装入 6 个培养瓶中, 在 95% O_2 、5% CO_2 、37℃ 条件下培养 12~18 h 后用于实验。

1.2.2 高温和内毒素复合因素对巨噬细胞 IL-1 β mRNA 表达的调节作用 1~6 号培养瓶中分别装 15 ml 培养液, 向 3、4、5、6 号培养瓶中各加入 LPS 5 μ l (使 LPS 终浓度为 0.1 μ g/ml)。将 1、3 号培养瓶放入 37℃ 含 95% O_2 、5% CO_2 的细胞培养箱中, 将 2、6 号培养瓶放入 40℃ 含 95% O_2 、5% CO_2 的细胞培养箱中, 将 4、5 号培养瓶分别放入 38℃ 和 39℃ 含 95% O_2 、5% CO_2 的细胞培养箱中, 于 1、2、3 h 后取出, TRIzol 提取总 RNA 用核酸蛋白分析仪 260 nm 和 280 nm 处检测 RNA 的浓度和纯度, 1% 琼脂糖凝胶电泳证实其完整性, RT-PCR 方法检测巨噬细胞 IL-1 β mRNA 的表达, 设定 RT-PCR 的循环次数分别为 26、28、30、32、34 取平台期的前一个循环次数作为实验所用的循环次数。管家基因 hprt (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖核酸转移酶) 作为内源性对照物。

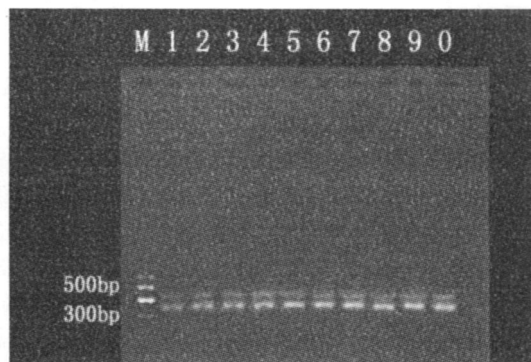
1.2.3 统计学处理 计量资料数据均用 SPSS 10.0 进行方差分析。

2 结果

2.1 高温和内毒素复合因素对巨噬细胞 IL-1 β mRNA 表达的影响

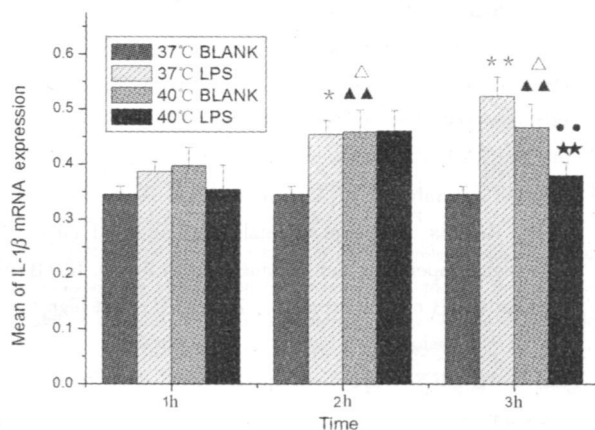
温度与内毒素对 RAW264.7 细胞 IL-1 β mRNA 表达均有影响, 温度升高能引起 IL-1 β mRNA 表达上调, 内毒素在 37℃ 条件下能够上调 RAW264.7 细胞 IL-1 β mRNA 的表达, 但高温内毒素复合因素则会下调 RAW264.7 细胞 IL-1 β mRNA 的表达 (图 1)。以 hprt 为内对照, 采用 Gel-Pro system 3.1 分析 RT-PCR 结果, 半定量结果: 37℃ 条件下, LPS 组随着时间的不断延长, IL-1 β mRNA 的表达不断增强, 至 2 h 时与空白对照组差异已有统计学意义 ($P < 0.05$), 3 h 时差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 40℃ 不加 LPS 组 IL-1 β mRNA 表达亦表现出不断增强, 其中 3 h 2 h 与 1 h 比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 与 37℃ 的空白对照组比增高更加显著 ($P < 0.01$); 40℃ 条件下 LPS 组 IL-1 β mRNA 的表达表现为先增强

后下降, 其中 LPS 处理 3 h 后 IL-1 β mRNA 的表达较 LPS 处理 2 h 减弱, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与 37℃ 条件下的 LPS 组相比减弱更加明显 ($P < 0.01$) (图 2)。



M: Mark; 1: Blank; 2: 37℃ LPS 1 h; 3: 37℃ LPS 2 h; 4: 37℃ LPS 3 h; 5: 40℃ Blank 1 h; 6: 40℃ Blank 2 h; 7: 40℃ Blank 3 h; 8: 40℃ LPS 1 h; 9: 40℃ LPS 2 h; 0: 40℃ LPS 3 h

图 1 高温内毒素复合因素对 RAW264.7 细胞 IL-1 β mRNA 表达的影响

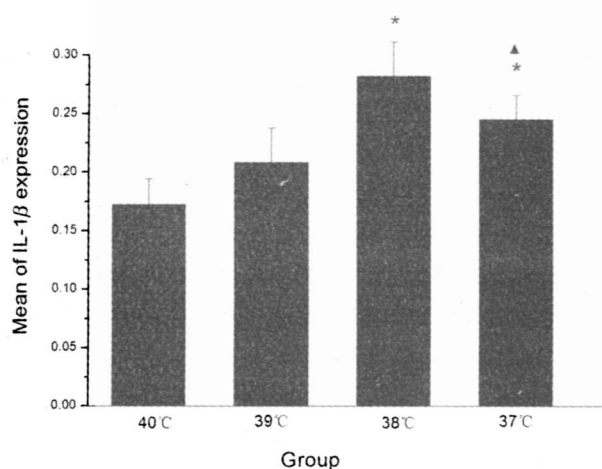


与同温度同时间空白对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与同温度 1 h 组比, $\Delta P < 0.05$; 与 37℃ Blank 组比, $\blacktriangle P < 0.01$; 与 40℃ LPS 2 h 组比, $\star\star P < 0.01$; 与 37℃ LPS 3 h 组比, $\bullet\bullet P < 0.01$

图 2 不同时间高温内毒素复合因素对 RAW264.7 细胞 IL-1 β mRNA 表达的影响

2.2 不同温度下内毒素对 RAW264.7 细胞 IL-1 β mRNA 表达的影响

将 RAW264.7 细胞加入 LPS 后放入 37℃、38℃、39℃、40℃ 培养箱中处理 3 h 后, IL-1 β mRNA 的表达随温度的不断升高呈现出先上调后下调的趋势, 其中以 38℃ 时表达最高, 40℃ 表达最低 (图 3)。说明温度对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 IL-1 β mRNA 表达作用在 38℃ 时最强, 而更高温度则会下调 RAW264.7 细胞在 LPS 刺激下的 IL-1 β mRNA 表达 (图 4)。



与 40°C LPS 组比较, * $P < 0.05$; 与 38°C LPS 组比较, ▲ $P < 0.05$

图 3 不同温度下内毒素对 RAW264.7 细胞 IL-1β mRNA 表达的影响

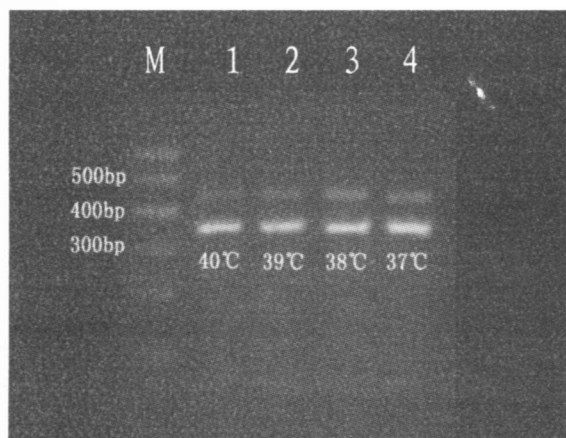


图 4 不同温度和内毒素复合因素下 IL-1β mRNA 的表达

3 讨论

内毒素刺激单核巨噬细胞释放大量白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1), IL-1 是主要的内源性致热原^[1]。IL-1β mRNA 的表达及生物作用在多个水平上可被其他因素调整, 包括 IL-1β 的转录激活, IL-1β mRNA 的稳定性, Pro-IL-1β 转录后蛋白水解酶对其的加工, IL-1β 受体的天然拮抗物与其结合后产生的抑制作用^[2]。JA Schmid 等的实验结果显示, 提高温度能够诱导 HSP70 和 HSP90 的产生而下调 IL-1β 的生物合成^[3]。近年来的研究证实 HSF-1 抑制内毒素引起的 IL-1β 启动子的转录是通过直接与 IL-6 核因子相互作用而实现的^[4]。RAW264.7 细胞热应激后热休克蛋白 mRNA 的表达及蛋白合成均随时间延长而增加, 在 6 h 时达到最高峰, 24 h 时回复到应激前的水平^[5]。本实验结果提示, 随着高温作用时间的延长, 40°C 条件下 Blank 组 IL-1β mRNA 表现出增强的趋势, 其中 3 h、2 h 与 1 h 比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 3 h 与 2 h 之间差异无统计学意义, 表现

出表达稳定的趋势 (图 2)。可见短时间热应激并未使 IL-1β mRNA 表达下降, 只是随着热应激作用时间的延长才使得 IL-1β mRNA 表达下降。同时我们也观察到 40°C 条件下 LPS 组 IL-1β mRNA 表达出现了先上调而后下调的变化趋势, 3 h 与 2 h 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (见图 1、图 2), 这与 Susanna Velasco 在相同条件下用 U-373 (astrocytoma cell lines) 所观察到的结果类似^[6]。由此得出这样一个事实: 高温内毒素复合因素刺激比单纯热应激更能抑制 IL-1β mRNA 表达。高温对热休克蛋白表达的影响是显而易见的, 至于在热休克蛋白的合成与分泌中内毒素产生的影响则有待更深入的探讨。

另一方面, 实验中我们也观察到 RAW264.7 细胞在不同温度下 IL-1β mRNA 的表达以 38°C 时表达最高, 40°C 表达最低 (图 3、图 4), 究其原因可能是在 38°C 条件下热休克蛋白并未发挥作用, 但适当地升高温度却能够引起基因表达及蛋白合成的增加, 而 38°C 恰好是 RAW264.7 细胞 IL-1β mRNA 表达的最适温度, 于是出现了实验中见到的 38°C 条件下 IL-1β mRNA 表达较 37°C 时和 40°C 时要高的情况。但是否 HSP70、HSP90、NF-IL6 或 HSF-1 的活性或某一因子的作用也受温度变化的影响, 是否在 38°C 时的作用活性最弱而最终导致了 IL-1β mRNA 表达在不同温度条件下的差异则有待进一步探讨。

总之, 单纯高温或内毒素均能上调 RAW264.7 细胞 IL-1β mRNA 的表达, 但高温内毒素复合因素却能够下调 RAW264.7 细胞 IL-1β mRNA 表达, 其表达作用在 38°C 时最强。

参考文献

- [1] 曹中伟, 张顺才. 内毒素的结构与生物遗传学特征 [A]. 见: 张顺才. 内毒素基础与临床 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 1-21.
- [2] Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist [J]. Int Rev Immunol 1998; 16 (5-6): 457-499.
- [3] Brandenburg K, Wiese A. Endotoxins: relationships between structure, function and activity [J]. Curr Top Med Chem 2004; 4 (11): 1127-1146.
- [4] Xie Y, Chen C, Stevenson MA, et al. Heat shock factor 1 represses transcription of the IL-1β gene through physical interaction with the nuclear factor of interleukin-6 [J]. J Biol Chem 2002; 277 (14): 11802-11810.
- [5] 王韵, 李昌麟, 王兴宇, 等. 热休克反应负调节小鼠巨噬细胞 IL-8 的表达 [J]. 科学通报, 2003; 48 (7): 686-690.
- [6] Velasco S, Tarlow M, Olsen K, et al. Temperature dependent modulation of lipopolysaccharide induced interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha expression in cultured human astroglial cells by dexamethasone and indomethacin [J]. J Clin Invest 1991; 87 (5): 1674-1680.