论著

文章编号:1000-5404(2006)08-0746-04

缺氧条件下大鼠单核细胞 NF-κB 活性及 TNF-α、IL-1β 表达变化规律的研究

徐 智[1],吴国明[1],钱桂生[1],王兴胜[1],陈维中[1],李淑平[1],薛 桥[2],王士雯[2] ([1]第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037;[2]解放军总医院老年心血管病研究所,北京 100853)

提 要:目的 研究缺氧培养的大鼠外周血单核细胞核转录因子 κB(NF-κB)结合活性及肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-1β(IL-1β)表达的变化规律,探讨缺氧与全身炎症反应综合征的关系,为进一步研究老年多器官功能障碍综合征的肺启动机制奠定基础。**方法** 采用明胶法分离大鼠外周血单核细胞,于低氧条件下(3% O_2, 5% CO_2, 92% N_2)培养 0、1、3、6、9、12、24 h 后,收集细胞及培养液上清,分别采用电泳迁移分析法(EMSA)、逆转录 PCR(RT-PCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测其 NF-κB 活性及 TNF-α、IL-1β 表达量。**结果** 缺氧 1 ~ 12 h,NF-κB 结合活性及 TNF-α、IL-1β 表达量均显著高于正常($P<0.01$),其峰值见于缺氧 6 h。缺氧 24 h,上述指标与正常无显著差异($P>0.05$)。NF-κB 结合活性与 TNF-α、IL-1β mRNA 和蛋白表达水平显著相关($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论** 缺氧可显著增强大鼠外周血单核细胞的 NF-κB 结合活性,并可诱导其产生大量的促炎症因子 TNF-α、IL-1β,这些变化可能与急性呼吸窘迫综合征时血浆中大量促炎症因子持续存在密切相关。

关键词: 缺氧; 核转录因子 κB; 肿瘤坏死因子-α; 白介素-1β

中图法分类号: R364.4;R392.12;R392.13 **文献标识码:** A

Hypoxia enhances activation of NF-kappa B and induces TNF-α, IL-1β expression in rat monocytes

XU Zhi[1], WU Guo-ming[1], QIAN Gui-sheng[1], WANG Xing-sheng[1], CHEN Wei-zhong[1], LI Shu-ping[1], XUE Qiao[2], WANG Shi-wen[2] ([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Institute of Geratic Cardiology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of NF-κB binding activity, TNF-α and IL-1β expression in rat peripheral blood monouclear cells (PBMC) during hypoxia, and explore the relationship between hypoxia and system inflammation response syndrome (SIRS) for the further study of the primordial role of lung in the pathogenesis of the multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in the elderly. Methods Purified rat PBMC were exposed to hypoxia (3% O_2, 5% CO_2, 92% N_2) for 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 h. NF-κB binding activity was detected by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The expression of NFT-α and IL-1β were detected by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Results NF-κB binding activity and the expression of TNF-α and IL-1β increased significantly during 1 – 12 h exposure to hypoxia ($P<0.01$), peaked at 6 h. After 24 h exposure to hypoxia, indexes above showed no significant difference between the hypoxia groups and control group ($P>0.05$). There were significant positive correlations between NF-κB binding activity and the expression of TNF-α and IL-1β ($P<0.01-0.05$). Conclusion Hypoxia enhances NF-κB binding activity in rat PBMC, and up-regulates the expression of TNF-α and IL-1β in mRNA and protein levels subsequently. These changes might be one of the mechanisms of a mass of proinflammatory factors in blood plasma in acute respiratory distress syndrome patients.

Key words: hypoxia; nuclear factor kappa B; tumor necrosis factor alpha; interleukin-1 beta

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G2000057004)

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G2000057004)

作者简介: 徐 智(1973 -),男,四川省乐山市人,博士研究生,医师,主要从事老年多器官功能不全的肺启动机制方面的研究。电话:(023)68755320

通讯作者: 吴国明,电话:(023)68774603

收稿日期: 2005-10-17;**修回日期:** 2006-01-19

临床和实验研究表明，急性肺损伤（acute lung injure，ALI）和急性呼吸窘迫综合征（acute respiratory distress syndrome，ARDS）与多器官功能障碍综合征（multiple organ dysfunction syndrome，MODS）的发生密切相关，多数 ALI/ARDS 患者不同程度合并有肺外器官功能障碍。在 MODS 发生发展过程中，ALI 出现最早、发生率最高[1]。ARDS 实质上是一种以进行性呼吸困难和顽固性低氧血症为特征的急性呼吸衰竭。顽固性低氧血症不仅是 ARDS 的重要特征，也是继发多脏器损害的重要发病机制。缺氧导致器官功能损害除与细胞能量代谢障碍、代谢性酸中毒有关外，还可能与炎症细胞被激活，炎症因子大量释放有关。本研究通过观察缺氧培养的大鼠外周血单核细胞 NF-κB 活性及 TNF-α、IL-1β 表达的变化规律，旨在探讨缺氧激活炎症细胞产生炎症因子在 MODS 发病机制中的作用。

1　材料与方法

1.1　试剂及仪器

RPMI1640（GIBCO 公司）；大鼠淋巴细胞分离液（上海试剂厂）；Oligo（dT），dNTP，MMLV 逆转录酶，RNA 酶抑制剂，*Taq* DNA 酶（Promega 公司）；TNF-α、IL-1β ELISA 试剂盒（晶美生物公司）；第 2 代 DIG Gel Shift 试剂盒，Tripure（Roche 公司）；其它试剂为国产分析纯。PTC-200 DNA 扩增仪（MJ 公司，USA）；Alphalmager 2200 凝胶成像分析系统（Alpha. Innotech 公司，USA）；酶联免疫检测仪 HTS 7000（PE 公司，USA）；O_2-Elerktrodenset 型缺氧恒温培养箱（Heraeus 公司，德国）。Wistar 大鼠 70 只（雌雄不拘，由第三军医大学实验动物中心提供）。

1.2　大鼠外周血单核细胞分离培养

参照文献[2]方法进行。调整细胞终浓度至 5×10^5/ml。

1.3　细胞低氧处理和实验分组

采用数字随机表法将 70 瓶大鼠外周血单核细胞随机分为缺氧 0、1、3、6、9、12、24 h 组。各组细胞分别在低氧细胞培养箱（3% O_2，5% CO_2，92% N_2）中培养相应的时间后，500 r/min 离心收集细胞和培养液上清备用。在抽提细胞总 RNA 和核蛋白前采用台盼蓝拒染法作细胞活力检测，各组细胞拒染率均 > 95%。

1.4　TNF-α、IL-1β mRNA 表达量的检测

采用 Tripure 一步法提取大鼠外周血单核细胞总 RNA，1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定，紫外分光光度计测定其纯度并定量。RT-PCR 采用两步法，即先取总 RNA 3 μg 逆转录为 cDNA，然后进行 PCR 扩增。大鼠 TNF-α、IL-1β、β-actin 引物采用引物设计软件 Primer Primier5.0 自行设计（序列见表 1）。引物由上海基康生物技术有限公司合成。

PCR 扩增条件：TNF-α、IL-1β 扩增条件为 94 ℃ 预变性 2 min，接着 94 ℃ 40 s，60 ℃ 50 s，72 ℃ 90 s，进行 35 个循环；β-actin 扩增条件为 94℃ 预变性 2 min，接着 94 ℃ 40 s，56 ℃ 50 s，72 ℃ 90 s，进行 35 个循环；末次循环后 72 ℃ 延伸 10 min。

PCR 产物的半定量分析：PCR 后取 10 μl 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像仪扫描成像，采用 Alpha. Innotech 公司图像软件测定各条带积分光密度值（以灰度表示）。以同一样品的 TNF-α、IL-1β 和 β-actin 产物条带积分光密度值之比（ATNF-α/Aβ-actin；A IL-1β/Aβ-actin）作数据分析，以此反映 TNF-α、IL-1β 的 mRNA 表达程度。

表 1　TNF-α、IL-1β、β-actin 引物序列

基因	引物序列	目的片段长度
TNF-α	上游 5′-TAC TGA ACT TCG GGG TGA TTG GTC C-3′ 下游 5′-CAG CCT TGT CCC TTG AAG AGA ACC-3′	295 bp
IL-1β	上游 5′-AAG CTC TCC ACC TCA ATG GAC AG-3′ 下游 5′-CTC AAA CTC CAC TTT GGT CTT GA-3′	260 bp
β-actin	上游 5′-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3′ 下游 5′-AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C-3′	587 bp

1.5　细胞培养上清中 TNF-α、IL-1β 浓度检测

采用 ELISA 法检测，具体方法按试剂盒说明进行。

1.6　NF-κB 活性检测

核蛋白提取参照文献[3]进行。将核蛋白提取液蛋白浓度调至 0.5 μg/μl。采用第 2 代 DIG Gel Shift 试剂盒检测 NF-κB 活性，具体步骤按试剂盒说明进行，结果用 X 射线胶片显影，图像扫描存入计算机后用图像软件测定各条带积分光密度值（以灰度表示），以积分灰度值表示 NF-κB 的活性变化。

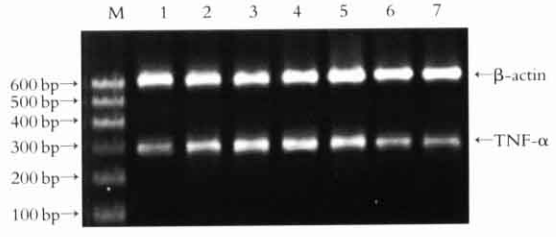
1.7　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 进行，组间比较单因素方差分析（SNK 法），NF-κB 结合活性与 TNF-α、IL-1β mRNA 及蛋白表达水平的相关性采用双因素相关分析（Pearson 法）。

2　结果

2.1　缺氧对大鼠外周血单核细胞 TNF-α、IL-1β mRNA 表达的影响

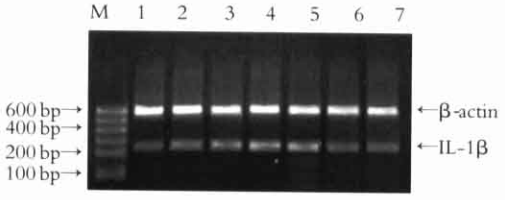
缺氧 1、3、6、9 h 组 TNF-α mRNA 表达量分别为（0.313 ± 0.027）、（0.427 ± 0.029）、（0.336 ± 0.023）、（0.320 ± 0.025），显著高于正常对照组（0.144 ± 0.026）（$P<0.01$），缺氧 12 h 组 TNF-α mRNA 表达量与正常对照组之间无显著差异（$P>0.05$），缺氧 24 h 组 TNF-α mRNA 表达量（0.113 ± 0.017）显著低于正常对照组（$P<0.05$），见图 1。



M：标准；1：对照组；2－7：缺氧 1、3、6、9、12、24 h 组

图 1　缺氧条件下大鼠外周血单核细胞 TNF-α mRNA 表达变化

缺氧 1 ~ 12 h 组 IL-1β mRNA 表达量(0.280 ± 0.025)、(0.306 ± 0.044)、(0.330 ± 0.025)、(0.393 ± 0.029)、(0.208 ± 0.018)显著高于正常对照组(0.166 ± 0.023)($P < 0.01$),缺氧 24 h 组 IL-1β mRNA 表达量(0.187 ± 0.033)与正常对照组之间无显著差异($P > 0.05$),见图 2。



M:标准;1:对照组;2 -7:缺氧 1、3、6、9、12、24 h 组

图 2 缺氧条件下大鼠外周血单核细胞 IL-1β mRNA 表达变化

2.2 缺氧对大鼠外周血单核细胞培养液上清中 TNF-α、IL-1β 浓度的影响

缺氧 1 ~ 12 h,细胞培养液中的 TNF-α、IL-1β 浓度显著高于正常对照组($P < 0.01$,$P < 0.05$),缺氧 24 h 细胞培养液中的 TNF-α、IL-1β 浓度与正常对照组间无显著差异($P > 0.05$),见表 2。

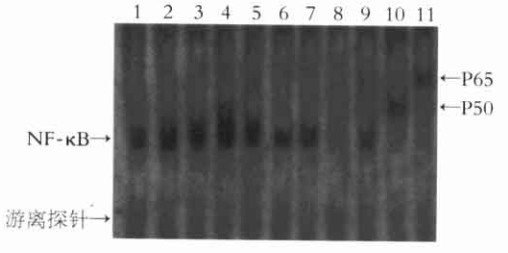
表 2 缺氧条件下大鼠外周血单核细胞 TNF-α, IL-1β 浓度变化($n = 7$, $x \pm s$)

组别	TNF-α 浓度(pg/ml)	IL-1β 浓度(pg/ml)
对照组	88.733 ±7.324	147.719 ±5.992
缺氧 1 h 组	104.279 ±9.660[a]	165.514 ±6.976[a]
缺氧 3 h 组	138.010 ±9.462[a]	169.273 ±7.070[a]
缺氧 6 h 组	150.426 ±8.050[a]	178.546 ±13.546[a]
缺氧 9 h 组	133.021 ±4.404[a]	189.574 ±6.029[a]
缺氧 12 h 组	100.572 ±9.993[b]	193.835 ±10.896[a]
缺氧 24 h 组	90.800 ±7.054	160.251 ±8.913

a:$P < 0.01$,b:$P < 0.05$,与对照组比较

2.3 缺氧对大鼠外周血单核细胞核蛋白 NF-κB 结合活性的影响

缺氧 1 ~ 9 h NF-κB 结合活性分别为(514.84 ± 23.76)、(597.18 ± 17.94)、(810.76 ± 27.93)、(646.67 ± 24.23),显著高于正常对照组(404.02 ± 22.34)($P < 0.01$),缺氧 12、24 h NF-κB 结合活性与正常对照组间无显著差异($P > 0.05$),见图 3。



1:对照组;2 -7:缺氧 1、3、6、9、12、24 h 组;8:加入未标记特异探针;9:加入标记非特异探针;10、11:加入抗-P50 和抗-P65 抗体

图 3 缺氧条件下大鼠外周血单核细胞 NF-κB 结合活性变化

2.4 NF-κB 结合活性与 TNF-α、IL-1β mRNA 及蛋白表达水平的相关性

相关分析表明,NF-κB 结合活性与 TNF-α、IL-1β mRNA 表达水平显著相关(r 值分别为 0.754、0.799,$P < 0.01$),NF-κB 结合活性与 TNF-α、IL-1β 蛋白表达水平也显著相关(r 值分别为 0.902、0.337,P 值分别 < 0.01、< 0.05)。

3 讨论

研究表明,缺氧可使人或动物血浆中的促炎症因子如 TNF-α、IL-1、IL-6 等水平升高[4,5],但其机制尚未完全阐明。既往的研究认为,缺氧可诱导内皮细胞产生细胞间黏附分子 1 和血管细胞黏附分子 1,增强中性粒细胞、巨噬细胞与血管内皮细胞的黏附,从而激活炎症细胞[6]。但另有证据表明,缺氧尚可直接诱导炎症细胞产生促炎症因子。Scannell 等[7]研究发现,低氧刺激人单核细胞株(THP-1)30 min 后,TNF-α 即显著升高,其峰值可持续 1 ~ 18 h。近年来,缺氧能否直接诱导炎症因子表达存在一定争议。少数学者认为缺氧诱导炎症因子表达需要 LPS 的协同作用[8]。但针对多种细胞(人巨噬细胞株、人肺泡巨噬细胞、大鼠单核细胞、牛肺微血管内皮细胞等)的研究表明,单纯缺氧确能诱导炎症因子表达。

目前关于缺氧诱导炎症因子产生的机制存在各种假说,涉及活性氧的产生、前列腺素 H 合成酶 2 生成过多等,但少有研究提及 NF-κB 的作用。最近,Jeong 等[9]在其研究中发现,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、缺氧诱导因子-1(HIF-1)和 NF-κB 可能参与缺氧诱导 IL-6 表达的信号传导。NF-κB 作为细胞中一个重要的转录因子,参与调节多数促炎症因子的转录和表达,如 TNF-α、TNF-β、黏附分子、白介素(IL-1、2、6、8、12)、集落刺激因子、干扰素等[10]。实验证明,缺氧可激活 NF-κB,后者可能在缺氧诱导炎症因子基因转录和表达中起重要作用。因此,对 NF-κB 在缺氧诱导单核细胞产生炎症因子中的调控作用有待深入研究。

本实验通过低氧培养(3% O_2,5% CO_2,92% N_2)的方法复制了大鼠外周血单核细胞的缺氧模型,并观察了其 NF-κB 活性和 TNF-α、IL-1β 表达的变化规律。实验结果显示,常氧条件下,大鼠外周血单核细胞仅表达少量的 TNF-α、IL-1β;缺氧 1 h,TNF-α、IL-1β 的表达量(mRNA 水平和蛋白水平)即显著高于正常对照组($P < 0.01$);二者的表达量分别于缺氧 6、9 h 达峰值(与正常对照组比较,$P < 0.01$)。随后两者的表达量逐渐下降:至缺氧后 12 h,TNF-α mRNA 表达量与正常对照组无显著差异($P > 0.05$);缺氧后 24 h,IL-1β

mRNA 表达量与正常对照组无显著差异($P>0.05$);缺氧后 24 h,TNF-α、IL-1β 的蛋白表达量均与正常对照组无显著差异($P>0.05$)。

缺氧后 NF-κB 结合活性的变化与 TNF-α、IL-1β 表达的变化趋势非常相似:缺氧早期(1 h),NF-κB 即被迅速激活,至缺氧后 6 h,NF-κB 结合活性即达到峰值,缺氧 1 ~9 h,NF-κB 结合活性均显著高于正常对照组($P<0.01$),缺氧 12 ~24 h,NF-κB 结合活性均与正常对照组无显著差异($P>0.05$)。相关性分析结果显示,NF-κB 结合活性与 TNF-α、IL-1β mRNA 及蛋白表达水平呈显著正相关($P<0.01$ ~0.05)。

以上实验结果表明,缺氧早期即可激活 NF-κB,且在缺氧 9 h 内其活性增强呈时间依赖性。基于 NF-κB 在炎症因子基因转录和表达中的重要作用,以及本实验中 NF-κB 结合活性与 TNF-α、IL-1β mRNA 及蛋白表达水平之间的显著相关性,我们有理由认为,NF-κB 在缺氧诱导单核细胞产生炎症因子中起着重要的调控作用。

如前所述,ALI/ARDS 是以顽固性低氧血症和全身炎症反应综合征为特征的临床危重症。持续严重的低氧是 ALI/ARDS 患者发展为多器官功能障碍和死亡的重要因素。我们的实验结果提示,持续缺氧可激活单核细胞的 NF-κB,并诱导 TNF-α、IL-1β 大量产生。因此,我们不难理解 ALI/ARDS 时全身炎症反应综合征持续存在的机制。同时,我们推测尽快纠正缺氧,阻断缺氧对 NF-κB 的激活,可能为 ALI/ARDS 的防治提供一条新的策略。

但到目前为止,缺氧是通过何种机制激活 NF-κB,其信号通路涉及哪些分子,以及我们实验中发现 IL-1β mRNA 的表达下降较 NF-κB 活性下降延迟了约 3 h,缺氧时 IL-1β 表达是否存在其他的调控机制,这些疑问尚不得而知。因此,有必要进行更为深入的研究,以期为防治 ALI/ARDS 提供切实可行的方法。

参考文献:

[1] CROUSER E D, DORINSKY P M. Gastrointestinal tract dysfunction in critical illness: pathophysiology and interaction with acute lung injury in adult respiratory distress syndrome/multiple organ dysfunction syndrome[J]. New Horiz, 1994, 2(4): 476 -487.

[2] 雷著斌, 秦永文, 沈　茜, 等. 明胶法分离外周血单核细胞[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(12): 1039 -1040.

[3] LI C, HA T, LIU L, *et al.* Adenosine prevents activation of transcription factor NF-kappa B and enhances activator protein-1 binding activity in ischemic rat heart[J]. Surgery, 2000, 127(2): 161 -169.

[4] MINOGUCHI K, TAZAKI T, YOKOE T, *et al.* Elevated production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome[J]. Chest, 2004, 126(5): 1473 -1479.

[5] TSAI B M, WANG M, PITCHER J M, *et al.* Hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary artery tissue cytokine expression are mediated by protein kinase C[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 287(6): L1215 -L1219.

[6] BECK SCHIMMER B, SCHIMMER R C, MADJDPOUR C, *et al.* Hypoxia mediates increased neutrophil and macrophage adhesiveness to alveolar epithelial cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 25(6): 780 -787.

[7] SCANNELL G, WAXMAN K, KAML G J, *et al.* Hypoxia induces a human macrophage cell line to release tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptors *in vitro*[J]. J Surg Res, 1993, 54(4): 281 -285.

[8] MENG X, AO L, SHAMES B D, *et al.* Inhibition of cyclic-3′,5′-nucleotide phosphodiesterase abrogates the synergism of hypoxia with lipopolysaccharide in the induction of macrophage TNF-alpha production[J]. J Surg Res, 2001, 101(2): 210 -215.

[9] JEONG H J, HONG S H, PARK R K, *et al.* Hypoxia-induced IL-6 production is associated with activation of MAP kinase, HIF-1, and NF-kappaB on HEI-OC1 cells[J]. Hear Res, 2005, 207(1 -2): 59 -67.

[10] SILSWAL N, SINGH A K, ARUNA B, *et al.* Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(4): 1092 -1101.

(编辑　龙　亮)

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神,血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg),但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡](kPa)的换算系数(1 mmHg = 0.133 kPa)。

本刊编辑部