论著

文章编号:1000-5404(2006)22-2250-03

烧伤小鼠 IFIT1 表达的初步观察

李洪涛[1],粟永萍[1], Jian-ming XU[2],王军平[1],艾国平[1],程天民[1] ([1]第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[2] Dept. of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine,77030 Houston USA)

提 要:目的 观察烧伤小鼠干扰素诱导表达蛋白 IFIT1 的表达变化,初步探究其表达变化的原因。**方法** 实验小鼠致 TBSA 15% Ⅱ度烧伤,1 d 及 7 d 后处死,取肝、肺及脾组织。脂多糖掺入小鼠腹腔巨噬细胞株 RAW264.7 的培养基中,至终浓度 0.1 ~ 1.0 μg/ml,作用 6 h。提取组织及细胞 RNA,进行半定量逆转录-聚合酶链式反应,提取组织及细胞裂解上清,进行免疫印迹检测。**结果** 小鼠肝、肺、脾组织 IFIT1 的转录在烧伤后 1 d 升高,伤后 7 d 恢复至伤前水平;肝、肺、脾 IFIT1 的蛋白水平在伤后 1 d 一致升高,伤后 7 d 仍能检出升高。体外实验,细菌脂多糖显著激活 RAW264.7 细胞的 IFIT1 转录及蛋白表达。**结论** 烧伤小鼠伤后早期 IFIT1 表达迅速升高,此变化与同期的内毒素血症引起的细胞应激有关。

关键词: 干扰素诱导表达蛋白;烧伤;脂多糖;细胞应激

中图法分类号: R341;R394-33;R644.02 **文献标识码:** A

IFIT1 expression in burned mice

LI Hong-tao[1], SU Yong-ping[1], XU Jian-ming[2], WANG Jun-ping[1], AI Guo-ping[1], CHENG Tian-min[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; [2]Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, 77030 Houston, USA)

Abstract: Objective To investigate the expression of interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1) in burned mice and its mechanism. **Methods** Kunming mice were inflicted second-degree burn covering 15% of the total body surface (TBSA) on the back. Another five normal mice served as controls. The mouse peritoneal macrophage cell line RAW264.7 was stimulated by 0.1 – 1 μg/ml lipopolysaccharide for 6 h. The mouse tissues of liver, lungs and spleen on day 1 or 7 after burn and RAW264.7 cells were disposed to extract total RNA and protein, then IFIT1 mRNA and protein levels were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction and Western blotting. **Results** Transcription of IFIT1 in liver, lungs and spleen of burned mice was apparently increased one day after burn, and 7 days later, the mRNA recovered to normal level. IFIT1 protein levels were elevated one day after burn, and still detectable 7 days later. *In vitro*, lipopolysaccharide strongly induced the expressions of IFIT1 mRNA and protein in RAW264.7 cells. **Conclusion** The expression level of IFIT1 in mice was sharply elevated at the early stage of burn injury, and endotoxemia may be one reason of this change.

Key words: interferon induced protein; burn injury; lipopolysaccharide; cell stress

IFIT1 (interferon induced factor1 with tetratricopeptide repeats)的发现及研究始于20世纪80年代[1],因为被I型干扰素(IFNα/β)诱导表达,且含蛋白结合的功能单元——TPR 模式序列(tetratricopeptide repeats motif)而得名。人源 IFIT1 的分子量 56×10^3,故又称为 P56,小鼠同源蛋白分子量为 54×10^3,有报道称之为 Mu P56[2]。新近研究报道,病毒感染时产生的双链 RNA 及旁分泌的 IFNα/β 可激活细胞,IFIT1 因而异常迅速地高表达[3];随之结合真核细胞翻译启始因子 eIF3,干扰翻译启始复合物的装配,从而抑制 mRNA 的翻译,降低蛋白质合成水平,是真核细胞抵御病毒感染的机制之一,而称之为病毒感染应激分子[4]。本研究中烧伤小鼠 IFIT1 表达增高,并通过对细菌脂多糖刺激体外培养细胞的观察,初步探究 IFIT1 表达增高的原因。

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054201),海外青年学者合作研究基金资助项目(30328025)

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" projects, G1999054201) and the China-Joint Research Fund for Overseas Chinese Young Scholars (30328025)

作者简介: 李洪涛(1969 –),男,辽宁省东港市人,博士,主治医师,主要从事创伤基础方面的研究。电话:(023)68771726, E-mail: lihongtao871066@yahoo.com.cn

通讯作者: 粟永萍, E-mail: suyping@yahoo.com

收稿日期: 2005-11-21;**修回日期:** 2006-08-12

1　材料与方法

1.1　实验动物

健康昆明小鼠 15 只，体质量 15 ~ 20 g，雌雄不拘，由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2　细胞株

小鼠腹腔巨噬细胞株 RAW264.7，购自 American Type Culture Collection（ATCC）。

1.3　试剂

固体培养基、标准胎牛血清购自 Hyclone，脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）为美国 Sigma 公司产品，RNA 抽提试剂盒购自上海华舜，逆转录-聚合酶链式反应试剂盒购自大连宝生物公司，引物委托大连宝生物公司合成。组织细胞裂解液购自美国 Pierce 公司，兔抗 IFIT1 抗血清（以原核融合表达的 MBP-IFIT1 为抗原，免疫本地白兔，自行制备，另文发表），羊抗兔 IgG-HRP 及 DAB 显色试剂盒购自北京中杉生物公司。

1.4　分组及模型

小鼠随机分为正常对照组、烧伤 1 组及烧伤 2 组，每组 5 只，烧伤组于其背部剪毛，以凝固汽油涂抹、烧灼，致 15% 体表面积Ⅱ度烧伤。烧伤 1、2 组小鼠分别于伤后 1 d 及 7 d 扭颈处死，取肝、肺、脾组织各 30 mg，提取 RNA；各 50 mg，提取组织蛋白。

1.5　细胞培养及 LPS 诱导

采用 DMEM 培养基加入 10% 胎牛血清，5% CO_2 浓度，37 ℃培养，细胞生长至铺满培养瓶底 80% 时，在培养基中掺入 LPS，终浓度分别至 0.1、0.5、1.0 μg/ml，继续培养 6 h 后，收获细胞。

1.6　提取 RNA

按试剂盒说明操作。以高温去酶处理的玻璃匀浆器研磨组织匀浆，培养细胞则直接加入 1 ml 混悬裂解液，将悬液移入 1.5 ml EP 管，经漩涡震荡，注射器抽打，室温静置 5 min 后，加入氯仿，颠倒混匀，12 000 r/min 离心 10 min，移 500 μl 水相至 1.5 ml EP 管，加入冰预冷的 75% 乙醇 250 μl，Tip 混匀，移入层析柱，12 000 r/min 离心 30 s，弃收集液，加 500 μl 去蛋白液，离心 30 s，加 500 μl 洗涤液，洗涤 2 次。将吸附柱放入干净的 1.5 ml EP 管中，在吸附膜中央加入 50 μl 去酶水，静置 5 min，待 RNA 完全溶解后，离心收集 RNA 溶液。

1.7　逆转录聚合酶链式反应（RT-PCR）

从 GenBank 获得小鼠 IFIT1 及作为内参照的看家基因 GAPDH、β-actin 的 mRNA 序列，应用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物，上下游引物跨越不同的外显子，以免污染的基因组 DNA 影响实验结果。以等量的 RNA 样本先进行逆转录反应，然后进行后续 PCR 反应，不同目的片段 PCR 反应的退火温度不同，但其加样量相同，且热循环次数维持 28 次不变。琼脂糖凝胶电泳显示实验结果，Bio-Red 凝胶成像仪上观察照相。

IFIT1 引物：正义链 5′-GCTACCACCTTTACAGCAACCAT-3′，反义链 5′-AATCTTGGCGATAGGCTACGACT-3′，产物片段：580 bp。

内参照 GAPDH 的目的片段 680 bp，β-actin 的目的片段 470 bp。

1.8　提取总蛋白

以玻璃匀浆器研磨组织匀浆，培养细胞则直接加入细胞裂解液，低温离心后，以 Bradford 法测定总蛋白含量，混合 2 × SDS-PAGE 上样缓冲液，煮沸 5 min 变性，待聚丙烯酰胺凝胶电泳。

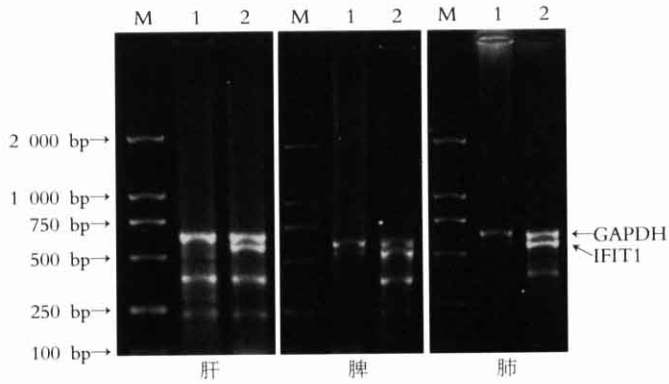
1.9　免疫印迹检测

以 10% 的分离胶，4% 的分离胶进行 SDS-PAGE，半干电转移（25 V，30 min）至 PVDF 膜上，1% 脱脂奶粉室温封闭，加入兔 IFIT1 抗血清至 1∶200，4 ℃孵育过夜，PBST 摇动洗膜（5 min × 5 次），加入辣根过氧化酶标记的羊抗兔 IgG，室温孵育 1 h，以 DAB 显色。

2　结果

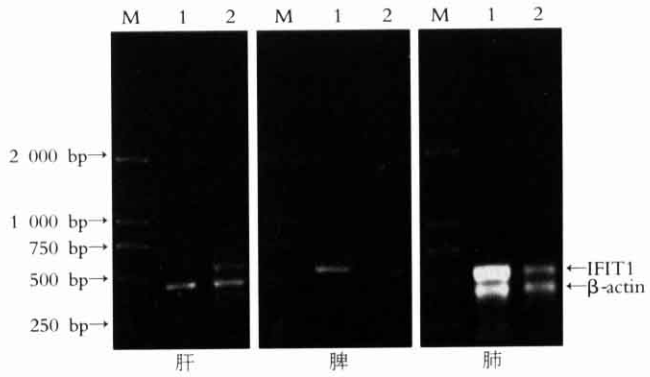
2.1　烧伤小鼠 IFIT1 mRNA 的变化

正常小鼠肝、脾、肺组织 IFIT1 的 mRNA 水平低，与作为内参照的看家基因 GAPDH 的转录水平相近或略低。烧伤后 1 d，肝、脾、肺组织 IFIT1 的 mRNA 水平迅速升高（图 1）。小鼠烧伤后 7 d，肝、脾、肺组织 IFIT1 的 mRNA 水平与正常对照小鼠相比没有明显变化，与作为内参照的看家基因 β-actin 的 mRNA 水平相近或略低，显示 IFIT1 的转录已恢复至伤前水平（图 2）。



GAPDH：RT-PCR 反应的内参照；M：DNA 分子量标记物；1：正常组；2：烧伤组

图 1　2 组小鼠烧伤后 1 d 肝、脾、肺组织 IFIT1 mRNA 表达

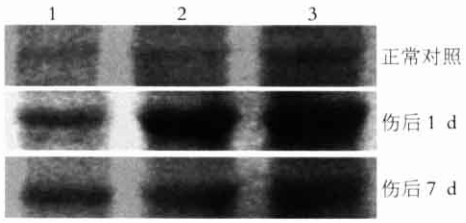


β-actin：RT-PCR 反应的内参照；M：DNA 分子量标记物；1：正常组；2：烧伤组

图 2　2 组小鼠烧伤 7 d 后肝、脾、肺组织 IFIT1 的 mRNA 表达

2.2　烧伤小鼠 IFIT1 的蛋白水平变化

以免疫印迹检测，正常对照小鼠 IFIT1 表达甚低或不能检出，伤后 1 d，明显提高，至伤后 7 d，仍能发现较明显的升高（图 3）。

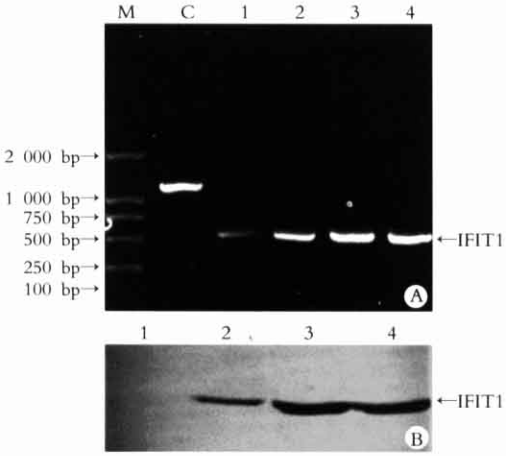


1：肝；2：腺；3：肺

图3 免疫印迹检测烧伤小鼠早期 IFIT1 的蛋白水平

2.3 LPS 刺激巨噬细胞株 RAW264.7 引起的 IFIT1 表达变化

LPS 作用6 h 后，可明显激活 IFIT1 的 mRNA 表达，且激活效应随 LPS 终浓度的升高而增强，LPS 浓度至0.5 μg/ml 时，激活效应达到最大，至1 μg/ml 时未进一步升高。免疫印迹检测的蛋白水平呈相似的变化过程（图4）。



A：RT-PCR 检测结果；B：免疫印迹检测的 IFIT1 蛋白水平变化
M：核酸分子量标记物；C：RT－PCR 阳性反应对照；1－4：掺入培养基中 LPS 的终浓度0、0.1、0.5、1 μg/ml

图4 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 IFIT1 的表达

3 讨论

以往的研究[5]表明，未被诱导的体外培养细胞，IFIT1 的 mRNA 及蛋白水平很低或不能检出，受病毒感染产生的双链 RNA 及干扰素的诱导后，IFIT1 的转录水平数小时内迅速升高，停止刺激，其 mRNA 及蛋白分子水平也随之下降，表明 IFIT1 在病毒感染及干扰素介导的细胞生理过程中有重要作用。进一步的 IFIT1 功能研究[4]表明 IFIT1 可以与真核细胞翻译起始因子 eIF-3 的亚单位 P48 结合，干扰 eIF-3 的成熟，及进一步的翻译启始复合物 eIF3. eIF2. GTP. Met-tRNAi 的装配，而抑制蛋白质合成，抵御病毒感染。同期的报道也指出非病毒感染性细胞应激条件下，如：LPS[6]、白细胞介素-1、视黄酸[3]等也可诱导细胞表达 IFIT1。对 IFIT1 在此类细胞应激时的功能或效应还缺乏研究报道。

烧伤动物伤后早期存在不同程度的内毒素血症，同期也存在大量炎症介质、细胞因子释放入血的情况，推测这些综合因素的作用可能激活烧伤小鼠组织细胞 IFIT1 的表达。实验结果证实了这一推断，烧伤小鼠伤后1 d，肝、肺、脾脏 IFIT1 的转录及蛋白水平迅速升高，伤后7 d mRNA 至正常水平，而免疫印迹检测的蛋白仍维持在较高的水平，表明 IFIT1 的表达正在恢复过程中。由于是初步的观察，对烧伤小鼠 IFIT1 的表达分布、表达升高、下降的时相变化，仍需进一步的补充报道。体外实验以培养的小鼠腹腔巨噬细胞株为对象，观察到细菌脂多糖刺激6 h 后，IFIT1 的转录被激活，蛋白水平迅速升高，且这种变化与 LPS 的刺激剂量相关。提示烧伤后的内毒素血症是引起小鼠 IFIT1 表达激活的一个原因。烧伤小鼠伤后早期大量炎症介质、细胞因子释放入血，其中的白介素-1、视黄酸也可能激活 IFIT1 的表达。对烧伤小鼠 IFIT1 的表达激活原因有待进一步探究。

IFIT1 是一细胞质内诱导型分子，高表达的 IFIT1 可抑制细胞的翻译，因而抵御病毒的增生、侵袭，同时宿主细胞的生长、增殖及修复受到影响[2]，故推测，非病毒感染所诱发的 IFIT1 高表达可能因相似的途径而影响细胞的活力，进而影响组织脏器的损伤修复，但还缺乏实验依据。创伤后继发损伤的发病机制研究可能为治疗提供新思路，并可预防和减轻并发症，降低死亡率、致残率，提高治愈率[7]。我们通过初步的观察发现，烧伤小鼠伤后早期组织细胞 IFIT1 的表达被迅速激活，进一步扩大观察的伤类，摸清表达的规律，深入研究 IFIT1 在内毒素、炎性因子应激等细胞病理过程中的功能/效应，可能为伤后继发脏器损伤的机制研究提供新的线索。

参考文献：

[1] WATHELET M G, CLAUSS I M, CONTENT J, *et al*. The IFI-56K and IFI-54K interferon-inducible human genes belong to the same gene family[J]. FEBS Lett, 1988, 231(1): 164－171.

[2] TERENZI F, PAL S, SEN G C. Induction and mode of action of the viral stress-inducible murine proteins P56 and P54[J]. Virology, 2005, 340(1): 116－124.

[3] GUO J, PETERS K L, SEN G C. Induction of the human protein P56 by interferon, double-stranded RNA or virus infection[J]. Virology, 2000, 267(2): 209－219.

[4] HUI D J, TERENZI F, MERRICK W C, *et al*. Mouse p56 blocks a distinct function of eukaryotic initiation factor 3 in translation initiation [J]. J Biol Chem, 2005, 280(5): 3433－3440.

[5] KUSARI J, SEN G C. Regulation of synthesis and turnover of an interferon-inducible mRNA[J]. Mol Cell Biol, 1986, 6(6): 2062－2067.

[6] SMITH J B, HERSCHMAN H R. The glucocorticoid attenuated response genes GARG-16, GARG-39, and GARG-49/IRG2 encode inducible proteins containing multiple tetratricopeptide repeat domains [J]. Arch Biochem Biophys, 1996, 330(2): 290－300.

[7] 王正国. 创伤基础研究进展[J]. 中华创伤杂志, 2005, 21(1): 6－10.

（编辑 王 红）