文章编号:1000-5404(2008)12-1151-03

论著

缺氧增加小鼠小胶质细胞 IRAK-4 的表达

陈 实,朱 刚 (第三军医大学西南医院神经外科,重庆 400038)

摘 要:目的 观察缺氧后小鼠小胶质细胞株 N9 对白细胞介素-1 受体相关激酶 4(interleukin-1 receptor associated kinase-4, IRAK-4)表达的变化,探讨小胶质细胞内炎症反应的相关机制。**方法** 将培养的 N9 细胞置于低氧(3% O_2,5% CO_2,92% N_2)条件下培养 1、3、6、12、24 h,用 Western blot 检测蛋白表达的变化,用激光共聚焦技术观察 IRAK-4 在细胞内表达变化情况,用酶联免疫吸附法检测培养液上清肿瘤坏死因子 α(TNF-α)含量。**结果** N9 细胞 IRAK-4 的蛋白表达随缺氧时间延长而逐渐增高,1 h 开始增加,3 h 增加明显($P<0.01$),6 h 达高峰,12 h 仍维持在较高水平($P<0.01$),24 h 下降与常氧无显著性差异($P>0.05$)。激光共聚焦也显示随着缺氧时间的延长,荧光强度逐渐加强。培养液上清 TNF-α 含量的变化也符合相似的变化趋势。IRAK-4 蛋白表达水平与培养液上清 TNF-α 含量的变化呈显著的正相关($r=0.863$, $P<0.05$)。**结论** 缺氧可以增加小鼠小胶质细胞内 IRAK-4 的蛋白表达,提示中枢神经系统内存在对免疫反应起着调控作用的 TLR/IL-1R 家族信号转导系统,调控下游炎症反应。

关键词: 缺氧;白细胞介素-1 受体相关激酶-4;小胶质细胞;继发性脑损伤
中图法分类号: R322.81;R364.4;R394.2 **文献标识码:** A

Hypoxia increases IRAK-4 expression in cultured murine N9 microglia cells

CHEN Shi, ZHU Guang (Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of the microglia inflammatory response through observing the changes of interleukin-1 receptor associated kinase-4(IRAK-4) expression in murine N9 microglia cells under hypoxia. Methods N9 cells were exposed to 3% O_2, 5% CO_2, 92% N_2 for 1, 3, 6, 12 and 24 h respectively. The IRAK-4 protein level was detected by Western blotting and the celluar change was observed by laser scanning confocal microscope(LSCM). The TNF-α level was measured by ELISA. Results After hypoxia, the expression of IRAK-4 protein was increased in a time-dependent manner. The elevation began at 1 h after hypoxia, increased significantly at 3 h($P<0.01$), peaked at 6 h and remained in higher level at 12 h($P<0.01$). then decreased at 24 h ($P>0.05$). The fluorescence intensity of IRAK-4 also increased with the extension of anoxic time. The TNF-α level change were similar. There were significant positive correlations between the expression of IRAK-4 and TNF-α($P<0.05$). Conclusion Hypoxia could increase IRAK-4 expression in murine microglia cells. It suggests that TLR/IL-IR signaling may exist in central nervous system and regulate the subsequent inflammation response.

Key words: hypoxia; interleukin-1 receptor associated kinase-4; microglia; secondary brain injury

继发性脑损伤(secondary brain injury, SBI)常见于脑外伤、脑梗死、脑出血等多种脑损害,控制 SBI 的发展是提高临床疗效、降低死亡率和致残率的有效措施之一。而 SBI 后进行性脑组织缺血缺氧及其引起的瀑布性炎症反应被认为是导致脑细胞变性、坏死的主要原因。小胶质细胞是中枢神经系统主要的免疫细胞,主要参与中枢神经系统的免疫和炎症反应。IRAK-4 是白细胞介素-1 受体相关激酶(interleukin-1 receptor associated kinase, IRAK)家族的重要成员,是 TLR/IL-1R(Toll like receptor/interleukin-1 receptor)炎症信号通路上的关键调节因素之一,可引起信号转导的级联反应,最终导致炎症靶基因表达的增加[1]。本研究采用小胶质细胞缺氧模型,探讨缺氧后小胶质细胞内IRAK-4 及炎症因子 TNF-α 表达的特点。

1 材料与方法

1.1 材料

鼠小胶质细胞株 N9 由第三军医大学医学遗传学教研室白

基金项目:重庆市自然科学基金(2007BA5010)
Supported by Natural Science Foundation of Chongqing(2007BA5010)
作者简介:陈 实,男,吉林省吉林市人,硕士研究生,主治医师,主要从事脑血管病及神经系统免疫方面的研究。电话:(023)68773071, E-mail:chenshi416@163.com
通信作者:朱 刚,电话:(023)68765252
收稿日期:2008-02-27;修回日期:2008-03-26

云教授惠赠。IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)培养基购于美国 HyClone 公司。羊抗人 IRAK-4 抗体购于美国 Santa Cruz 公司,FITC 兔抗羊 IgG 购于北京中山公司。免疫印迹发光试剂购于美国 PIERCE 公司。肿瘤坏死因子-α(TNF-α)酶联免疫吸附法(ELISA)测定试剂盒购于美国 R&D Systems 公司。小牛血清购于甘肃民海公司,使用前经 56 ℃热灭活。缺氧恒温培养箱为德国 Heraeus 公司,激光共聚焦显微镜为德国 ZEISS 公司。

1.2 方法

1.2.1 N9 细胞培养 细胞 IMDM 培养基中添加了 0.05 mmol/L 二巯基乙醇,100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素。用含 10% 小牛血清的 IMDM 培养基 37 ℃,5% CO_2 条件下培养,0.25% 胰蛋白酶 +0.02% EDTA 混合液消化传代,3 ~5 d 传代 1 次。

1.2.2 缺氧方法 取生长良好的细胞,消化,调整细胞数为 1×10^6 ml^{-1},接种于 75 cm 培养瓶,生长至 80% 融合,换无血清培养液后置于缺氧孵箱,通入 3% O_2,5% CO_2,92% N_2 的混合气,37 ℃培养箱内培养 1、3、6、12、24 h,同时以常氧培养作对照。

1.2.3 IRAK-4 蛋白表达水平检测 采用蛋白质免疫印迹法,提取细胞总蛋白质进行 Western blot。细胞在常氧或 3% O_2 条件下培养不同时间,弃培养基,预冷 PBS 洗 3 次,加入适量 RIPA 裂解液,冰上孵育 20 min 后,用细胞刮匙刮起细胞并转移至预冷的 EP 管中,4 ℃,12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,-70 ℃保存备用。采用 BCA 法测定细胞总蛋白浓度,上样前加入 2×SDS 加样缓冲液 5 min,25 μg 蛋白质样品用 10% SDS-PAGE 分离后电转移至聚偏氟乙烯膜(PVDF 膜),5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,羊抗人多克隆抗体(1∶200)4 ℃过夜,TBST 洗 PVDF 膜 10 min×3 次,抗羊二抗(1∶1 000)室温孵育 2 h 后,用 TBST 洗膜 10 min×4 次,将化学发光试剂盒中的 A 和 B 两种试剂按等比混匀加至膜上,用凝胶成像系统拍照。结果中的条带用 Quantity One 4.4.0 软件分析光密度值,各条带的相对光密度值 = IRAK-4 条带光密度值/内参 GAPDH 条带光密度值。

1.2.4 免疫荧光 在 24 孔培养板内放置无菌的盖玻片(每片 0.8 cm×0.8 cm 左右),每孔种植细胞数为 1×10^5 ml^{-1},待细胞生长至 80% 融合状态时,按上述方法进行缺氧培养后取出盖玻片,PBS 冲洗,4% 多聚甲醛固定,封闭液 37 ℃封闭 1 h,一抗(羊抗人多克隆抗体)4 ℃孵育过夜,同时加 PBS 的细胞作阴性对照,二抗 37 ℃孵育 30 min,染核,激光共聚焦显微镜下观察并摄像。每个实验均独立重复 3 次,所选图片为 3 次中有代表性的结果。荧光亮度使用 Image-Pro Plus 5.1 软件进行分析。

1.2.5 培养上清液 TNF-α 水平测定 检测培养上清液 TNF-α 含量,操作按 ELISA 试剂盒说明书进行。

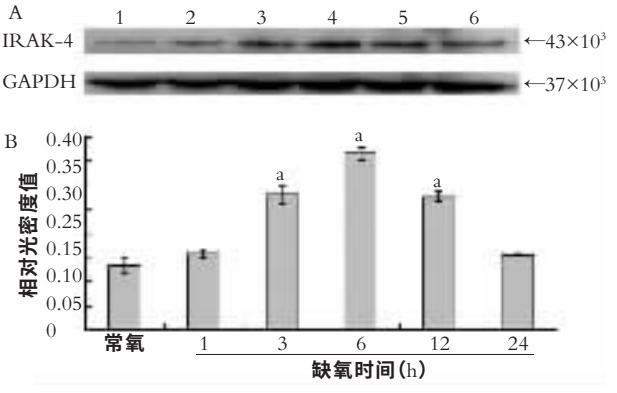
1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 软件进行单因素方差分析,组间两两比较使用 Fisher LSD 检验。IRAK-4 蛋白和 TNF-α 表达水平的相关性采用双因素相关分析(Pearson 法)。

2 结果

2.1 缺氧时 N9 细胞 IRAK-4 蛋白水平的变化

3% O_2 培养细胞 1、3、6、12、24 h 后,Western blot 结果,显示 3% O_2 培养时 N9 细胞中 IRAK-4 的蛋白表达逐渐增加,3 h 开始增加($P<0.01$),6 h 达高峰($P<0.01$),12 h 仍维持在较高水平($P<0.01$),24 h 下降与正常水平相当($P>0.05$,图 1)。

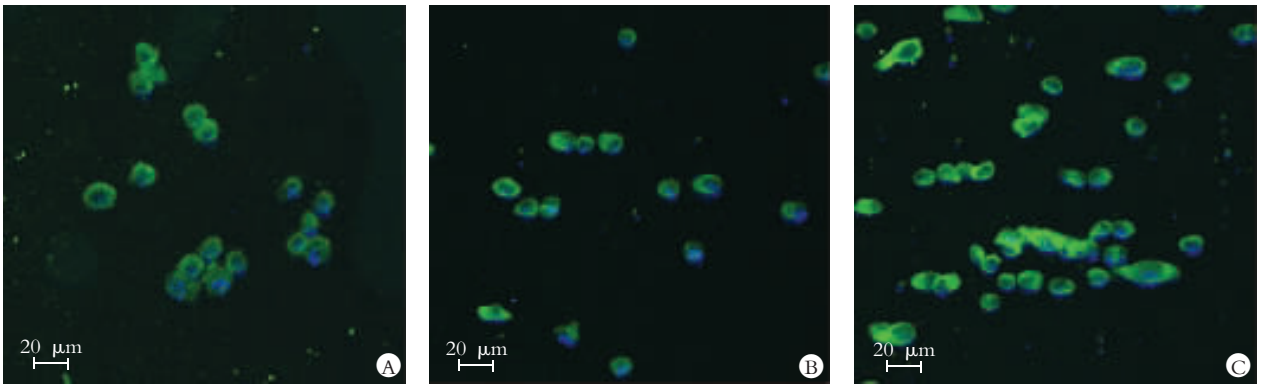


A:Western blot 结果 1 -6 分别为常氧,缺氧 1、3、6、12、24 h;
B:定量分析结果 a:$P<0.01$,与常氧组比较

图 1 缺氧条件下 N9 细胞 IRAK-4 蛋白的表达变化

2.2 IRAK-4 在细胞内的分布及缺氧后的变化

正常 N9 细胞内存在 IRAK-4 的表达,细胞染色主要集中于细胞质中。缺氧条件下 IRAK-4 的特异性荧光强度增强,随着缺氧时间延长,荧光强度逐渐加深(图 2)。



A:常氧;B:缺氧 3 h;C:缺氧 6 h

图 2 激光共聚焦显微镜观察 IRAK-4 在 N9 细胞的分布

2.3　缺氧对培养上清液 TNF-α 含量的影响

ELISA 结果显示缺氧后 TNF-α 含量增加,3 h 明显增加($P<0.01$),6 h 达高峰($P<0.01$),24 h 下降与正常水平相当(表1)。

表 1　缺氧对 N9 细胞培养上清液 TNF-α 含量的影响(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	TNF-α 含量
常氧组	3	113.884 1 ±2.795 3
缺氧 1 h 组	3	118.231 9 ±2.828 9
缺氧 3 h 组	3	164.753 6 ±5.187 1[a]
缺氧 6 h 组	3	184.608 7 ±5.126 0[a]
缺氧 12 h 组	3	120.115 9 ±4.355 1[a]
缺氧 24 h 组	3	116.927 5 ±2.715 2

a: $P<0.01$,与常氧组比较

2.4　IRAK-4 蛋白表达与 TNF-α 表达水平的相关性

相关分析表明,IRAK-4 蛋白与培养液上清 TNF-α 浓度表达水平呈显著正相关($r=0.863$, $P<0.05$)。

3　讨论

TLR/IL-1R 家族在各种感染性疾病诱发的免疫反应中起着中枢性的调节作用。而 IRAK-4 是 TLR/IL-1R 家族共同信号转导系统中的关键因子[3]。Suzuki 等[4]实验证明 IRAK-4$^{-/-}$鼠或细胞,脂多糖或 IL-1 均不能激活 NF-κB 等细胞因子。并且 IRAK-4$^{-/-}$鼠能高度耐受 LPS,不会发生感染性休克,而同剂量的 LPS 将导致 100% 的野生型鼠死亡。这些观察表明,IRAK-4 在 TLR/IL-1R 信号转导中具有不可或缺的地位。IRAK-4 是 IRAK-1 的上游因子,能较长时间地和受体复合物结合并且维持结构稳定,而 IRAK-1 则迅速从受体复合物解离[5,6]。

值得注意的是,上述有关炎症启动及信号转递的研究结果多数是以外周组织细胞和外周血免疫细胞为实验对象获得的。鉴于脑内血脑屏障的存在,外周血免疫细胞通常难以进入中枢神经组织中,因此,作为脑内固有免疫细胞的小胶质细胞参与了中枢神经系统炎症启动和信号传递[7]。充分研究小胶质细胞在炎症启动、级联反应瀑布及其炎症损伤机制可能是减轻 SBI 的关键之一。

缺氧可以激活小胶质细胞的活性,促进其产生多种免疫效应分子如 TNF-α 等[8]。这些效应分子各自通过作用于胶质细胞或神经元促进其他炎症分子的产生;它们之间也协同作用,促成了炎症反应形成和炎性产物水平持续升高,贯穿于病理发展全过程。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[9]。为了进一步了解中枢神经系统内炎症信号的转导,本实验采用小胶质细胞缺氧模型,研究小胶质细胞内炎症转导的 IRAK 信号系统。

实验结果表明作为中枢神经系统主要免疫细胞的小胶质细胞内,存在 IRAK 信号转导通路的关键因子 IRAK-4。实验结果还表明在缺氧条件下随着缺氧时间的延长,IRAK-4 的表达逐渐增多,3 h 开始明显增多($P<0.01$),6 h 达到峰值($P<0.01$),12 h 仍然维持在较高水平($P<0.01$),24 h 下降与正常水平相当($P>0.05$)。激光共聚焦的结果也说明了 IRAK-4 表达的随缺氧时间的延长而荧光亮度逐渐增强。IRAK-4 作为 IRAK 信号通路的上游分子,在小胶质细胞被激活后释放炎症因子 TNF-α。本研究结果也证实了炎症因子 TNF-α 和 IRAK-4 的表达增加在时程上具有一定的正相关性($r=0.863$, $P<0.05$)。说明 IRAK-4 参与了小胶质细胞内的炎症反应,缺氧可以诱导细胞内炎症反应的发生。

总之,本研究初步验证了中枢神经系统内存在 TLR/IL-1R 家族信号转导系统的关键因子 IRAK-4,细胞缺氧缺血后激活 TLR/IL-1R 信号,进而进一步激活下游炎症信号,引起炎症级联反应。但关于 IRAK-4 激活与失活的具体过程和机制仍不十分清楚,充分研究其调控机制可能对于很多感染性和炎症性疾病的治疗意义重大。

参考文献:

[1] Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors: their physiological role and signal transduction system[J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1(4): 625 - 635.

[2] 刘作金, 刘长安, 龚建平. IRAK-4: TLR/IL-1R 家族共同信号转导系统中的关键因子[J]. 生理科学进展, 2005, 36(3): 276 - 279.

[3] Rao N, Nguyen S, Ngo K, *et al*. A novel splice variant of interleukin-1 receptor (IL-1R)-associated kinase 1 plays a negative regulatory role in Toll/IL-1R-induced inflammatory signaling[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(15): 6521 - 6532.

[4] Suzuki N, Suzuki S, Duncan G S, *et al*. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4[J]. Nature, 2002, 416(6882): 750 - 756.

[5] Lye E, Mirtsos C, Suzuki N, *et al*. The role of interleukin 1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) kinase activity in IRAK-4-mediated signaling[J]. J Biol Chem, 2004, 279(39): 40653 - 40658.

[6] Su J, Richter K, Zhang C, *et al*. Differential regulation of interleukin-1 receptor associated kinase 1 (IRAK1) splice variants[J]. Mol Immunol, 2007, 44(5): 900 - 905.

[7] 薛　旸, 李海峰, 徐凌云. 小胶质细胞与炎症介导的神经系统退行性病变[J]. 生命科学, 2006, 19(1): 43 - 46.

[8] Ock J, Jeong J, Choi W S, *et al*. Regulation of Toll-like receptor 4 expression and its signaling by hypoxia in cultured microglia[J]. J Neurosci Res, 2007, 85(9): 1989 - 1995.

[9] 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.

(编辑　汪勤俭)