论著

文章编号:1000-5404(2009)20-1964-05

X盒结合蛋白1在低浓度皮质酮对巨噬细胞免疫功能调控中的作用

钟河江,周建云,蒋建新,王海燕,杨 策,严 军,刘 庆,程 英 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,全军交通医学研究所,全军交通伤重点实验室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨X盒结合蛋白1(X-box binding protein 1, XBP1)在低浓度皮质酮对小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能调控中的作用。**方法** 分离培养成年健康雄性C57BL/6小鼠腹腔巨噬细胞,应用XBP1-RNAi慢病毒或阴性对照慢病毒感染小鼠腹腔巨噬细胞,采用荧光显微镜观察感染效率,感染3、5 d后收集巨噬细胞提取总RNA,应用RT-PCR检测小鼠腹腔巨噬细胞XBP1 mRNA表达水平和干扰效率。XBP1-RNAi慢病毒或阴性对照慢病毒感染离体培养的小鼠腹腔巨噬细胞3 d后,再应用低浓度皮质酮(50 ng/ml)处理小鼠腹腔巨噬细胞1 h,分别应用ELISA法及激光共聚焦显微镜检测小鼠腹腔巨噬细胞培养上清中TNF-α生成及其吞噬功能变化。**结果** 当复感染指数(multiplicity of infection, MOI)值≥6时,XBP1-RNAi慢病毒能有效地感染小鼠腹腔巨噬细胞,感染效率>75%。应用RT-PCR检测发现XBP1-RNAi能有效地抑制小鼠腹腔巨噬细胞XBP1基因表达。通过选择性地沉默XBP1基因表达,低浓度皮质酮(50 ng/ml)对巨噬细胞吞噬功能增强的作用受到抑制,巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数均显著下降($P<0.01$),而且对TNF-α分泌增强的作用也受到抑制,显著低于阴性对照慢病毒组($P<0.01$)。**结论** 采用RNA干扰选择性地沉默XBP1,能有效地抑制低浓度皮质酮对巨噬细胞吞噬和TNF-α生成增强的作用。

关键词: 糖皮质激素;巨噬细胞;RNA干扰;XBP1;免疫功能

中图法分类号: R341;R392.12;R394.3 **文献标识码:** A

Role of XBP1 in immune function regulation of macrophage by low concentration of corticosterone

ZHONG He-jiang, ZHOU Jian-yun, JIANG Jian-xin, WANG Hai-yan, YANG Ce, YAN Jun, LIU Qing, CHENG Ying (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the role of X-box binding protein 1 (XBP1) in immune function regulation of macrophage by low conceatration of corticosterone. **Methods** Peritoneal macrophages were isolated from adult male C57BL/6 mice, and then infected with XBP1-RNAi lentivirus or negative control lentivirus. The infection efficiency was observed by fluorescence microscopy. Mice peritoneal macrophages were collected in 3 and 5 d after infection and total RNA were extracted. RT-PCR analysis was performed to detect the effect of RNA interference. Furthermore, mice peritoneal macrophages were cultured *in vitro* and infected with XBP1-RNAi lentivirus or negative control lentivirus for 3 d, and then treated with low concentration of corticosterone (50 ng/ml) for 1 h. TNF-α concentration in the cell culture supernatant and phagocytosis of macrophages were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and confocal microscopy, respectively. **Results** When the multiplicity of infection (MOI) was more than 6, the infection efficiency of XBP1-RNAi lentivirus was above 75% after infection 4 d. RT-PCR analysis confirmed that XBP1-RNAi lentivirus effectively inhibited the expression of XBP1 mRNA in mice peritoneal macrophages. Furthermore, after selectively silencing of the XBP1 gene, the enhancement of macrophage phagocytosis by low concentration of corticosterone was efficiently inhibited, phagocytic rate and phagocytic index of mice peritoneal macrophages were decreased

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2005CB522602);全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G080)

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2005CB522602) and the Tackling Program of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Sci & Tech Research of PLA (06G080)

作者简介: 钟河江,男,四川省资阳市人,博士,主治医师,讲师,主要从事创伤应激与器官保护方面的研究。电话:(023)68774682, E-mail:zhj@tmmu.edu.cn

通信作者: 蒋建新,电话:(023)68757401, E-mail:hellojjx@126.com

收稿日期: 2009-02-24;**修回日期:** 2009-04-27

markedly compared with that of negative control lentivirus group ($P<0.01$). Meanwhile, the enhancement of TNF-α production by low concentration of corticosterone was also depressed, the concentration of TNF-α in the cell culture supernatant was significantly declined in XBP-RNAi lentivirus group, compared with the negative control lentivirus group ($P<0.01$). **Conclusion** Selective silencing of XBP1 by RNA interference may effectively inhibit the enhancement of macrophage phagocytosis and TNF-α production by low concentration of corticosterone.

Key words: glucocorticoids; macrophage; RNA interference; X-box binding protein 1; immune function

糖皮质激素是下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal,HPA)轴的主要效应激素,在机体应激反应中起重要作用[1]。长期以来,糖皮质激素作为一种免疫抑制剂,一直被认为对免疫功能只有抑制作用。然而,近年来研究发现,糖皮质激素对免疫系统可产生抑制与刺激双重作用,并呈剂量依赖方式[2]。在 LPS 和干扰素刺激情况下,低浓度糖皮质激素对巨噬细胞产生免疫刺激效应,而高浓度则产生免疫抑制作用[3-5]。研究表明,在无免疫刺激情况下,低浓度皮质酮(50 ng/ml)可明显增强巨噬细胞免疫功能,产生免疫刺激作用[6],然而,其分子机制目前尚不清楚。

大量研究表明,内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)与细胞免疫反应存在一定的内在联系[7-11]。内质网内环境紊乱可导致内质网腔内未折叠蛋白或错误折叠蛋白蓄积,即诱发 ERS。ERS 可激活未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),通过增强蛋白折叠、促进未折叠蛋白或错误折叠蛋白降解、减缓蛋白翻译等维持细胞内稳态,有一定的细胞保护作用。X 盒结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP1)是哺乳动物细胞 UPR 信号转导通路重要的转录因子之一[12],主要调控内质网分子伴侣和内质网相关降解基因的表达[13],对细胞功能状态具有重要的调控作用[14,15]。前期研究发现低浓度皮质酮(50 ng/ml)可诱导小鼠腹腔巨噬细胞发生 ERS,导致具有转录活性的剪接型 XBP1(spliced XBP1, XBP1-S)蛋白表达明显增加[16]。研究表明转录因子 XBP1 与细胞免疫功能关系密切[8,9]。然而 XBP1 是否参与低浓度皮质酮(50 ng/ml)对巨噬细胞免疫刺激作用,目前尚未明确。因此,本研究在成功构建小鼠 XBP1 基因 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)慢病毒的基础上[17],通过选择性地沉默小鼠腹腔巨噬细胞 XBP1 基因表达,探讨 XBP1 在低浓度皮质酮对巨噬细胞免疫功能调控中的作用。

1　材料与方法

1.1　材料

成年健康雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 20 ~ 25 g,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。实验前禁食,自由饮水。RPMI 1640 培养基购自 HyClone 公司(USA),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自民海生物,皮质酮(corticosterone)购自 Sigma 公司(USA),小鼠 XBP1、β-actin 基因引物由上海生工合成,Tripure 购自 Roche 公司(USA),ReverTra Ace 逆转录酶购自 TOYOBO 公司(日本),2 × *Taq* MasterMix 和 *E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞购于 TIANGEN 公司(北京),小鼠 TNF-α ELISA 检测试剂盒购自晶美生物工程有限公司(深圳),pET 16Rmyc 质粒由第三军医大学全军免疫研究所万瑛副教授惠赠,其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2　方法

1.2.1　小鼠腹腔巨噬细胞收集与培养　　脱臼处死小鼠,将动物仰卧放置,75% 酒精消毒腹部,将 5 ~ 10 ml 预冷 D-Hanks 液注入小鼠腹腔,并按摩腹部 1 ~ 2 min,沿正中线剪开腹壁,用吸管收集腹腔液于无菌离心管中,以 1 000 r/min 离心 5 min,用 RPMI 1640 完全培养基(含 10% FBS, 100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素)重悬细胞,将细胞接种于 6 孔细胞培养板。37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱内培养 2 h,弃去上清,用预温 PBS 液洗涤细胞 2 次,贴壁细胞即为腹腔巨噬细胞,每孔加入 2 ml RPMI 1640 完全培养基后继续培养过夜。

1.2.2　慢病毒感染小鼠腹腔巨噬细胞　　感染前 1 d,将小鼠腹腔巨噬细胞接种于 96 孔细胞培养板,5×10^3/孔,每孔加培养基 100 μl,37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱内培养过夜,感染前为细胞换液,加入所需培养基 70 μl,根据复感染指数(multiplicity of infection, MOI)(0 ~ 12),分别加入相应量的慢病毒。感染 12 h 后观察细胞状态:如果没有明显的细胞毒性作用,继续培养 24 h 后更换培养基;如果有明显的细胞毒性作用,马上更换培养基。感染 4 d 后在荧光显微镜下观察慢病毒报告基因 GFP 表达情况,以确定最佳感染条件。

1.2.3　RT-PCR 检测小鼠腹腔巨噬细胞 XBP1 mRNA 表达　　将小鼠腹腔巨噬细胞随机数字法分为 3 组:①对照组:培养基继续培养;②阴性对照慢病毒组:加入 MOI 值为 6 的阴性对照慢病毒感染小鼠腹腔巨噬细胞;③XBP1-RNAi 慢病毒组:加入 MOI 值为 6 的 XBP1-RNAi 慢病毒感染小鼠腹腔巨噬细胞。在慢病毒感染 3、5 d 后,分别提取巨噬细胞总 RNA,运用 RT-PCR 方法检测小鼠腹腔巨噬细胞 XBP1 mRNA 表达情况。XBP1 基因上游引物:5′-AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC-3′,下游引物:5′-GGATCTCATAAACTAGAGGCTTGGTG-3′,扩增产物大小为 601 bp。内参照 β-actin 基因上游引物:5′-TGATGGTGGGAATGGGTCAGAA-3′,下游引物为 5′-CCAAGAAGGAAGGCTGGAAAAG-3′,扩增产物大小为 675 bp。扩增产物以 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,溴化乙锭(EB) 0.5 μg/ml 染色。凝胶成像系统 VersaDoc 3000 型(Bio-Rad, USA)成像,应用 Quantity One (Bio-Rad, version 4.4.0)软件对扩增产物进行分析处理,目的基因表达量以平均吸光度(A)值 × 面积(Int × mm^2)表示,并

与内参照 β-actin 平均光密度值相比表示各组 XBP1 mRNA 相对表达量。

1.2.4 pET 16Rmyc 质粒在大肠杆菌中的诱导表达与计数

表达质粒 pET 16Rmyc 转化感受态大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3),克隆筛选,挑选含表达质粒的单克隆,37 ℃培养过夜,取 100 μl 接种于 10 ml LB 培养基中,37 ℃培养 4 ~ 6 h 后(A_{600}nm =0.4 – 0.6),取 1 ml 菌液,并收集菌体作为诱导表达前的对照,其余菌液中加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 1 mmol/L,26 ℃培养 12 h,4 ℃放置 24 h,取 1 ml 菌液并收集菌体。收集诱导前、后的细菌样品,滴加于载玻片上,在荧光显微镜下观察大肠杆菌表达红色荧光蛋白的情况。取诱导后菌体,应用梯度稀释法将菌液稀释,分别涂布于含氨苄抗性的 LB 固体培养基,置于 37 ℃孵箱培养过夜。记录菌落数,计算菌液中细菌浓度。

1.2.5 巨噬细胞吞噬功能检测 将小鼠腹腔巨噬细胞分为 3 组,分组及方法同 1.2.3。慢病毒感染的小鼠腹腔巨噬细胞继续培养 3 d 后,细胞换液,向每组小鼠腹腔巨噬细胞培养体系中加入终浓度为 50 ng/ml 皮质酮,并置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱内继续培养 1 h,收集细胞培养上清用于 TNF-α 浓度检测。用预温 PBS 溶液轻轻洗涤细胞 2 次,然后每孔准确加入 0.5 ml RPMI 1640 完全培养基以及 50 μl 细菌数为 2×10^8/ml 表达红色荧光蛋白的大肠杆菌,置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱内吞噬 30 min 后,弃上清,以预温 PBS 溶液洗涤细胞 5 次,4% 多聚甲醛固定后,以激发波长 488 nm、检测波长 568 nm 进行激光共聚焦显微镜观察并照相,每孔随机取 5 个视野。细胞内有红色荧光信号的巨噬细胞被视为吞噬了大肠杆菌的细胞,细胞吞噬功能以吞噬指数(phagocytic index, PI)和吞噬率(phagocytic rate, PR)表示。吞噬率 = 吞噬大肠杆菌的巨噬细胞数/巨噬细胞总数 ×100%;吞噬指数 = 巨噬细胞吞噬的大肠杆菌总数/吞噬大肠杆菌的巨噬细胞总数。

1.2.6 细胞培养上清中 TNF-α 浓度检测 按照 ELISA 检测试剂盒操作说明,每样本取 100 μl,检测慢病毒感染小鼠腹腔巨噬细胞 3 d 后,再以终浓度为 50 ng/ml 皮质酮处理 1 h 时细胞培养上清中 TNF-α 的浓度。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行分析处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用配对 t 检验判定差异的显著性。用 OriginPro 7.5 软件作图。

2 结果

2.1 感染效率检测结果

XBP1-RNAi 慢病毒感染小鼠腹腔巨噬细胞 4 d 后,应用荧光显微镜观察慢病毒报告基因 GFP 表达情况,发现 MOI 值在 0 ~ 12 范围内,随 MOI 值的增大,XBP1-RNAi 慢病毒对小鼠腹腔巨噬细胞的感染效率也逐步升高,其中 MOI 值≥6 时,慢病毒的感染效率均超过 75%;并且各慢病毒感染组细胞生长状态良好。结果提示 MOI 值≥6 时,XBP1-RNAi 慢病毒对小鼠腹腔巨噬细胞的感染效率均可满足实验要求,并且对细胞生长状态无明显影响(图 1)。

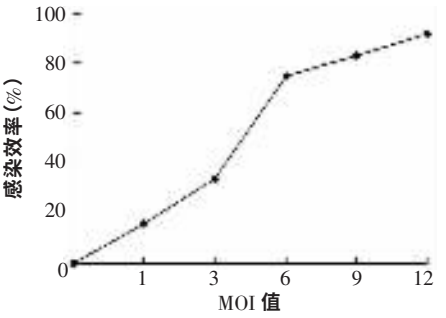
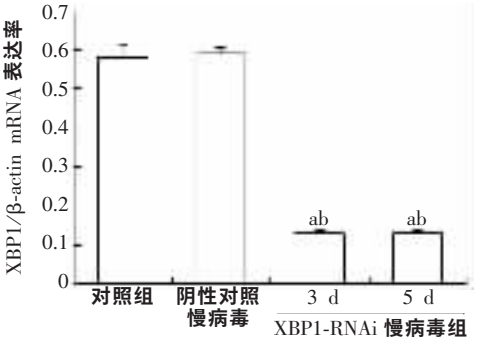


图 1 XBP1-RNAi 慢病毒对小鼠腹腔巨噬细胞的感染效率

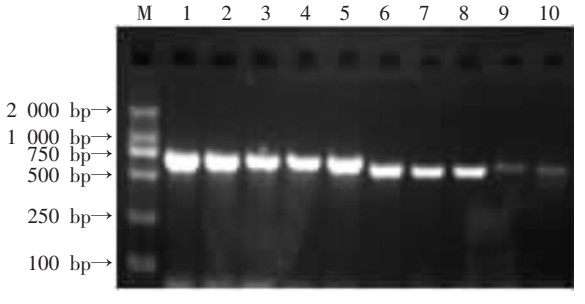
2.2 慢病毒感染对小鼠腹腔巨噬细胞 XBP1 mRNA 表达的影响

XBP1-RNAi 慢病毒及阴性对照慢病毒感染小鼠腹腔巨噬细胞 3、5 d 后,应用 RT-PCR 检测发现 XBP1-RNAi 慢病毒感染小鼠腹腔巨噬细胞 3 d 后,与对照组和阴性对照慢病毒组相比,巨噬细胞 XBP1 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$),并且这种抑制效应可持续到第 5 d(图 2、3)。表明 XBP1-RNAi 慢病毒感染 3、5 d 后,巨噬细胞 XBP1 mRNA 表达水平被显著抑制,提示 XBP1-RNAi 慢病毒能有效地沉默小鼠腹腔巨噬细胞 XBP1 基因表达。



a: $P < 0.01$, 与对照组比较;b: $P < 0.01$, 与阴性对照慢病毒组比较

图 2 XBP1-RNAi 慢病毒感染对巨噬细胞 XBP1 mRNA 表达的影响 ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$)

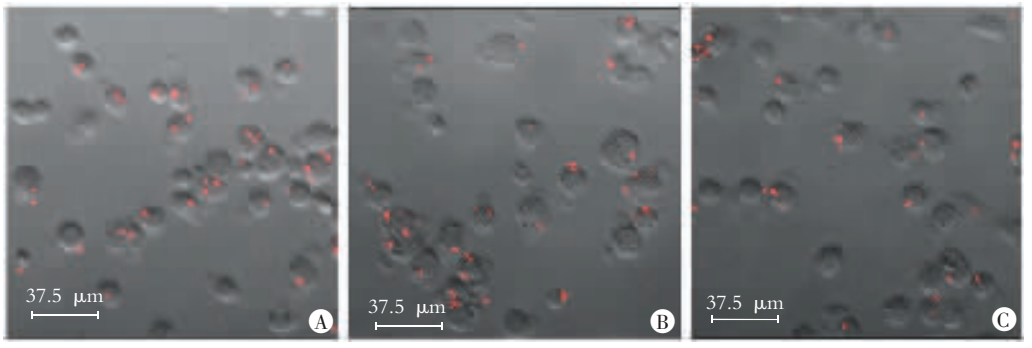


M: 标准;1、2、6、7: 对照组;3、8: 阴性对照慢病毒组;4、9: XBP1-RNAi 组 3 d; 5、10: XBP1-RNAi 组 5 d。其中 1 ~ 5 为 β-actin,6 ~ 10 为 XBP1

图 3 XBP1-RNAi 慢病毒感染后巨噬细胞 XBP1 mRNA 表达变化

2.3 pET 16Rmyc 在大肠杆菌中的诱导表达

含表达质粒 pET 16Rmyc 的单克隆细菌经异丙基硫代半乳糖苷(IPTG) 26 ℃诱导培养 24 h 后,肉眼可见菌液呈明显红色,在荧光显微镜下观察可见明显红色荧光,说明大肠杆菌能高



A:对照组;B:阴性对照慢病毒组;C:XBP1-RNAi 慢病毒组

图 4　激光共聚焦显微镜观察 XBP1-RNAi 慢病毒感染对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

效表达红色荧光蛋白,经梯度稀释涂布计数,测定细菌浓度为 2×10^8/ml。

2.4　巨噬细胞吞噬功能的变化

XBP1-RNAi 慢病毒感染小鼠腹腔巨噬细胞 3 d 后,应用激光共聚焦显微镜观察低浓度皮质酮(50 ng/ml)对 XBP1 基因沉默后巨噬细胞吞噬功能变化。发现 XBP1-RNAi 慢病毒感染后,小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能明显低于对照组和阴性对照慢病毒感染组,表现为巨噬细胞对大肠杆菌的吞噬率和吞噬指数均显著下降($P<0.01$),但阴性对照慢病毒组与对照组之间相差不显著(表 1,图 4),由此可见 XBP1 可能在介导低浓度皮质酮对巨噬细胞吞噬功能增强中起一定作用。

表 1　XBP1-RNAi 慢病毒感染对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响($n=4,\bar{x}\pm s$)

组别	吞噬率(%)	吞噬指数
对照组	67 ± 3.9	2.18 ± 0.14
阴性对照慢病毒组	71 ± 4	2.09 ± 0.17
XBP1-RNAi 慢病毒组	56 ± 3.7[b]	1.42 ± 0.13[ab]

a: $P<0.01$, 与对照组比较;b: $P<0.01$, 与阴性对照慢病毒组比较

2.5　巨噬细胞分泌 TNF-α 的变化

XBP1-RNAi 慢病毒或阴性对照慢病毒感染小鼠腹腔巨噬细胞 3 d 后,以终浓度为 50 ng/ml 皮质酮处理小鼠腹腔巨噬细胞 1 h,应用 ELISA 方法检测细胞培养上清中 TNF-α 浓度,发现在 XBP1-RNAi 慢病毒感染组,50 ng/ml 皮质酮并不能诱导巨噬细胞分泌 TNF-α 增加,与阴性对照慢病毒组相比明显下降($P<0.01$),但阴性对照慢病毒组和对照组之间相差不显著(表 2)。提示 XBP1 基因沉默能抑制低浓度皮质酮对巨噬细胞分泌功能增强的作用。

表 2　XBP1-RNAi 慢病毒感染对小鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF-α 的影响($n=4,\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α 浓度(pg/ml)
对照组	162.2 ± 10.6
阴性对照慢病毒组	156.5 ± 0.8
XBP1-RNAi 慢病毒组	145.9 ± 7.4[a]

a: $P<0.01$, 与阴性对照慢病毒组相比

3　讨论

内质网在所有真核细胞分泌性蛋白和膜蛋白生物合成及修饰中起着重要作用。细胞生长、分化及环境刺激等均可不同程度地增加内质网折叠蛋白负荷。细胞具有增强内质网折叠蛋白的能力,以应对生长发育和生理变化的需要。大量研究表明 UPR 在此过程中起重要的作用[18]。UPR 是一种复杂的多信号转导通路,主要由三个分支组成:蛋白激酶受体样内质网激酶(protein kinase receptor-like ER kinase, PERK)、激活转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6)和肌醇需要酶 1 (inositol-requiring enzyme 1, IRE1)。当细胞处于非应激状态时,这些蛋白与内质网分子伴侣葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78)紧密结合,呈非活化状态。当细胞发生 ERS 时,可诱发 GRP78 与这些蛋白分离,从而始动 UPR,激活下游信号转导级联,允许细胞处理应激。IRE1 是一种跨内质网膜的丝/苏氨酸受体蛋白激酶,具有核酸内切酶活性,与 GRP78 分离后就被激活,使 XBP1 的 mRNA 发生剪接,去除一个 26 bp 的内含子序列,产生剪接型 mRNA (XBP1-S mRNA),并发生翻译框移位,翻译生成具有转录活性的 XBP1-S 蛋白。XBP1-S 可与靶基因启动子区的未折叠蛋白反应元件(unfolded protein response element, UPRE)结合,促使靶基因转录,包括 HSP40 家族、内质网分子伴侣、XBP1 自身及内质网相关降解组份等。

XBP1 是具有分泌功能的细胞所必需的,如浆细胞分泌和抗体生成均需 XBP1[19],另外 XBP1 也参与外分泌细胞(如胰腺、唾液腺腺泡细胞和肝细胞)的分泌作用[20]。由于巨噬细胞是重要的分泌性免疫细胞,能产生大量的炎性介质,推测 XBP1 可能在调控巨噬细胞免疫功能方面具有重要作用。因此,本实验首先应用 XBP1-RNAi 慢病毒感染小鼠腹腔巨噬细胞,在感染 3、5 d 后,应用 RT-PCR 检测发现能明显抑制小鼠

腹腔巨噬细胞 XBP1 mRNA 表达。提示 XBP1-RNAi 慢病毒能有效地沉默小鼠腹腔巨噬细胞 XBP1 基因表达,这为研究 XBP1 基因在调控巨噬细胞免疫功能方面的作用奠定了良好基础。

前期研究表明低浓度皮质酮可明显增强巨噬细胞吞噬功能[6],为了进一步明确 XBP1 是否介导低浓度皮质酮对巨噬细胞吞噬功能的作用,我们将 XBP1-RNAi 慢病毒感染小鼠腹腔巨噬细胞,3 d 后应用激光共聚焦显微镜观察低浓度皮质酮(50 ng/ml)对 XBP1 基因沉默后巨噬细胞吞噬功能的影响,结果发现 XBP1-RNAi 慢病毒感染后小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能明显低于对照组和阴性对照慢病毒感染组,而阴性对照慢病毒组与对照组之间相差不显著,因此,提示 XBP1 可能在介导低浓度皮质酮对巨噬细胞吞噬功能增强中起一定作用。

细胞的分泌功能取决于内质网折叠、修饰新合成多肽的能力,也与内质网磷脂合成相关,以促进内质网-高尔基体网络对分泌蛋白的运输。以往研究表明转录因子 XBP1 可激活某些内质网分子伴侣基因表达,并始动内质网生物合成。Lee 等[19]发现 XBP1 是外分泌细胞生物合成所必需的,XBP1 基因敲除小鼠表现为分泌器官异常,如胰腺和唾液腺腺泡细胞内质网发育不良,并且内质网分子伴侣表达下调。胚胎期胰腺腺泡细胞发生明显凋亡。TNF-α 是巨噬细胞分泌的一种重要细胞因子,在机体免疫反应中有十分重要的作用。前期研究发现 50 ng/ml 皮质酮可显著促进巨噬细胞分泌 TNF-α[6]。在本研究中发现应用 XBP1-RNAi 慢病毒感染小鼠腹腔巨噬细胞,XBP1 基因表达水平下调后,应用 50 ng/ml 皮质酮处理不能促进巨噬细胞分泌 TNF-α 增加,提示 XBP1 可能在介导低浓度皮质酮对巨噬细胞的分泌功能增强中具有重要作用。

总之,本研究采用 XBP1-RNAi 慢病毒选择性地沉默小鼠腹腔巨噬细胞 XBP1 基因,结果发现 XBP1 基因沉默后低浓度皮质酮(50 ng/ml)不能诱导巨噬细胞吞噬功能增强和 TNF-α 生成增加。因此提示 XBP1 可能在低浓度皮质酮对巨噬细胞免疫功能调控中起重要作用。

参考文献:

[1] Sternberg E M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(4): 318 – 328.

[2] Sapolsky R M, Romero L M, Munck A U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions[J]. Endocr Rev, 2000, 21(1): 55 – 89.

[3] Lim H Y, Muller N, Herold M J, *et al*. Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration[J]. Immunology, 2007, 122(1): 47 – 53.

[4] Smyth G P, Stapleton P P, Freeman T A, *et al*. Glucocorticoid pretreatment induces cytokine overexpression and nuclear factor-kappaB activation in macrophages[J]. J Surg Res, 2004, 116(2): 253 – 261.

[5] Long F, Wang Y X, Liu L, *et al*. Rapid nongenomic inhibitory effects of glucocorticoids on phagocytosis and superoxide anion production by macrophages[J]. Steroids, 2005, 70(1): 55 – 61.

[6] 周建云, 蒋建新, 杨 策, 等. 皮质酮对大鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(2): 120 – 123.

[7] de-Almeida S F, Fleming J V, Azevedo J E, *et al*. Stimulation of an unfolded protein response impairs MHC class I expression[J]. J Immunol, 2007, 178(6): 3612 – 3619.

[8] Zhang K, Wong H N, Song B, *et al*. The unfolded protein response sensor IRE1alpha is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 268 – 281.

[9] Iwakoshi N N, Lee A H, Vallabhajosyula P, *et al*. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1[J]. Nat Immunol, 2003, 4(4): 321 – 329.

[10] Pino S C, OSullivan-Murphy B, Lidstone E A, *et al*. Protein kinase C signaling during T cell activation induces the endoplasmic reticulum stress response[J]. Cell Stress Chaperones, 2008, 13(4): 421 – 434.

[11] Yoshimura F K, Luo X. Induction of endoplasmic reticulum stress in thymic lymphocytes by the envelope precursor polyprotein of a murine leukemia virus during the preleukemic period[J]. J Virol, 2007, 81(8): 4374 – 4377.

[12] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(7): 519 – 529.

[13] Yamamoto K, Sato T, Matsui T, *et al*. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1[J]. Dev Cell, 2007, 13(3): 365 – 376.

[14] Lin J H, Li H, Yasumura D, *et al*. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response[J]. Science, 2007, 318(5852): 944 – 949.

[15] Lin J H, Li H, Zhang Y, *et al*. Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability[J]. PLoS One, 2009, 4(1): e4170.

[16] 钟河江, 蒋建新, 王海燕, 等. 皮质酮诱导小鼠腹腔巨噬细胞发生内质网应激的作用[J]. 现化生物医学进展, 2009, 9(7): 1233 – 1236.

[17] 钟河江, 蒋建新, 王海燕, 等. 小鼠 XBP1 基因 RNA 干扰慢病毒载体的构建及筛选[J]. 现化生物医学进展, 2009, 9(8): 1401 – 1404.

[18] Zhang K Z, Kaufman R J. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum[J]. J Biol Chem, 2004, 279(25): 25935 – 25938.

[19] Lee A H, Chu G C, Iwakoshi N N, *et al*. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands[J]. EMBO J, 2005, 24(24): 4368 – 4380.

[20] Ogawa S, Lozach J, Benner C, *et al*. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors[J]. Cell, 2005, 122(5): 707 – 721.

(编辑 吴培红)