论著

文章编号:1000-5404(2010)08-0794-04

缺氧条件下大鼠神经元白细胞介素-1受体相关激酶-1的表达变化

李江涛[1],胡胜利[1],杜 鹏[1],郑 江[2],缪洪平[1],吴国材[1],唐卫华[1],刘 智[1],朱 刚[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:神经外科,全军神经系统微创诊治专科中心[1],综合实验研究中心[2])

[摘要] **目的** 观察大鼠神经元B35细胞株中白细胞介素-1受体相关激酶-1(interleukin-1 receptor-associated kinases-1,IRAK-1)mRNA及蛋白在缺氧后表达量的变化,并探讨其变化与神经元中TNF-α表达的关系。**方法** 将培养的B35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、48、72 h,应用RT-PCR方法检测IRAK-1 mRNA表达的变化;Western blot检测IRAK-1蛋白含量的变化;激光扫描共聚焦观察IRAK-1在细胞内的分布及含量变化;酶联免疫吸附法检测培养液上清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的含量,并与IRAK-1蛋白进行相关分析。**结果** B35细胞IRAK-1 mRNA表达与正常对照相比,1 h开始增加[(0.786±0.042),$P<0.05$],3 h增加明显[(0.947±0.055),$P<0.05$],6 h达到高峰(1.245±0.077),$P<0.05$],12 h仍维持在较高水平[(0.911±0.041),$P<0.05$],24 h降至正常水平以下但无明显差异[(0.596±0.047),$P>0.05$],48 h以后进一步减少[(0.520±0.049),$P<0.05$]。IRAK-1蛋白表达变化也呈类似趋势。相关性分析结果显示,培养上清液中TNF-α含量的变化与IRAK-1蛋白表达变化呈正相关($r=0.88$,$P<0.05$)。**结论** 神经元内存在TLR/IL-1R家族信号转导系统的关键因子IRAK-1,缺氧损伤可诱导其表达,与TNF-α的表达相关。

[关键词] 白细胞介素-1受体相关激酶-1;缺氧;神经元

[中图法分类号] R331.8;R345;R364.4 **[文献标志码]** A

Hypoxia induces expression of interleukin-1 receptor-associated kinases-1 in rat neurons

Li Jiangtao[1], Hu Shengli[1], Du Peng[1], Zheng Jiang[2], Miao Hongping[1], Wu Guocai[1], Tang Weihua[1], Liu Zhi[1], Zhu Gang[1] ([1]Department of Neurosurgery, [2]Medical Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the dynamical changes of interleukin-1 receptor-associated kinases-1 (IRAK-1) mRNA and protein, and to explore the relationship between these changes and concentrations of TNF-α in rat B35 neurons under hypoxia. **Methods** B35 cells exposed to hypoxia of 3% O_2, 5% CO_2, and 92% N_2 were cultured for 1, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 h respectively, the mRNA and protein expressions of IRAK-1 were detected by RT-PCR and Western blot analysis, the distribution of IRAK-1 in the cells were observed by laser scanning confocal microscopy (LSCM), and the concentrations of TNF-α were measured by ELISA. **Results** The mRNA and protein expressions of IRAK-1 were increased after hypoxia for 1 h and decreased gradually after reaching the highest level at 6 h ($P<0.05$), so did the fluorescence intensity under LSCM and the concentrations of TNF-α. After 48 h, the concentrations of mRNA and protein were decreased lower than that in normoxia ($P<0.05$). The concentrations of TNF-α were correlated positively with the expression of IRAK-1 protein ($r=0.88$, $P<0.05$). **Conclusion** Hypoxia up-regulates the mRNA and protein of IRAK-1, which are correlated positively with the expression of TNF-α in rat B35 neurons.

[Key words] interleukin-1 receptor associated kinase-1; hypoxia; neurons

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BA5010). Correponding author: Zhu Gang, Tel-86-23-68765252, E-mail:zhugang6666@yahoo.com.cn

缺氧是常见的中枢神经系统损伤因素之一,由于中枢神经系统对氧的需求量大,对缺氧非常敏感,因而更易受到损害[1]。炎症是脑缺氧病理生理过程中的一个重要组成环节,由于炎症反应的复杂性和炎症因子的多样性,因此,脑缺氧后的炎症反应一直是研究的热点。白细胞介素-1受体相关激酶(interleukin-1 receptor-associated kinases,IRAK)是指在白细胞介素-1诱导下能和白细胞介素-1受体(interleukin-1 receptor,IL-1R)相结合的一类丝氨酸/苏氨酸激酶,这类蛋白与果蝇抵抗微生物感染所必需的Toll样受体(toll like receptor,TLR)通路上的pella激酶有高度同源性,可诱发一系列共同的细胞内信号转导,被统称为TLR/

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2007BA5010)

[通信作者] 朱 刚,电话:(023)68765252,E-mail:zhugang6666@yahoo.com.cn

IL-1R家族(toll like receptor/interleukin-1 receptor)。IRAK-1是IRAKs家族第1个成员,它在外周免疫器官参与炎症启动和TLR/IL-1R家族信号传递[2],而IRAK-1是否参与中枢神经系统炎症反应的调节,尚不清楚。本研究通过神经元缺氧模型,采用RT-PCR、Western blot和免疫荧光等方法,初步探讨神经元IRAK-1 mRNA和蛋白表达变化,以及这些变化与脑内炎症反应的关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大鼠神经元细胞株(B35)购自美国ATCC公司,DMEM(Dulbecc's modified Eagle medium)培养基及肽牛血清购自美国Gibco公司,总RNA提取试剂盒及RT-PCR试剂盒购自杭州博日科技公司,PCR引物由北京赛百盛科技公司合成,总蛋白提取液购自北京赛百盛科技公司,小鼠抗大鼠IRAK-1抗体购自美国Santa Cruz公司,山羊抗小鼠IgG二抗、兔抗大鼠β-actin抗体及羊抗兔IgG二抗购自北京博奥森公司,罗丹明标记的山羊抗小鼠IgG二抗购自北京中杉科技公司,肿瘤坏死因子-α(TNF-α)酶联免疫吸附法试剂盒(ELISA)测定试剂盒购自美国ADL公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 B35细胞在含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基,37 ℃、5% CO_2混合气体的孵箱中培养,4~5 d传代1次。取生长状态良好的细胞,接种于150 cm^2培养瓶,待细胞生长至50%~70%融合,换无血清DMEM低糖培养基后置于德国Heraeus恒温低氧细胞孵箱,通入3% O_2、5% CO_2、92% N_2混合气体,37 ℃培养1、3、6、12、24、48、72 h,同时以常氧条件培养作正常对照。

1.2.2 RT-PCR检测IRAK-1 mRNA表达 收集各时间点细胞分别提取总RNA,分光光度计测定浓度,用无RNase水将各时间点标本配制成统一浓度,进行RT-PCR检测,操作均按照试剂盒说明进行。IRAK-1的上游引物为5′-GCTGTGGACACCGATACCTT-3′,下游引物为5′-AGCAGCAAGCATGTTGAGCC-3′,目的片段大小为295 bp。PCR反应条件为:94 ℃预变性3 min后,94 ℃30 s,56 ℃30 s,72 ℃30 s,28个循环后,72 ℃延伸5 min。β-actin的上游引物为5′-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3′,下游引物为5′-GTGCATGGAGCCAGGGCAGTA-3′,目的片段大小为358 bp。PCR反应条件:94 ℃预变性3 min后,94 ℃30 s,56 ℃30 s,72 ℃30 s,28个循环后,72 ℃延伸5 min。反应完毕后以3%琼脂糖凝胶进行电泳。电泳条带图像采用美国Bio-Rad公司Quantity One 4.0图像分析软件进行分析。

1.2.3 Western blot检测IRAK-1蛋白表达 收集各时间点细胞分别提取总蛋白,测定浓度后,将各组细胞样品的蛋白浓度调整一致,等量上样进行SDS-PAGE,电泳完毕,将凝胶中的蛋白转移至PVDF膜上,PVDF膜以含5%脱脂奶粉的TBST液室温封闭4 h,加IRAK-1一抗(1∶1 000),4 ℃孵育过夜,二抗(1∶1 000)室温孵育2 h,将化学发光试剂盒中A和B试剂等比例混匀加至膜上反应3 min,显影,拍照。条带图像用美国Bio-Rad公司Quantity One 4.0图像分析软件分析光密度值。

1.2.4 免疫荧光检测IRAK-1蛋白表达 无菌盖玻片置于孔板内,加入少量细胞悬液和适量培养液,培养2~3 d,根据不同缺氧时间要求移入缺氧细胞孵箱,统一取出,PBS液漂洗,4%多聚甲醛固定,封闭液37 ℃封闭1 h,一抗(1∶200)4 ℃孵育过夜,二抗(1∶100)37 ℃孵育30 min,染核,封片,使用德国Leica TCSNT激光扫描共聚焦显微镜观察,并设置阴性对照。使用共聚焦显微镜自带软件分析细胞荧光强度变化。

1.2.5 培养上清液TNF-α水平测定 检测培养上清液TNF-α水平含量,按照ELISA试剂盒操作说明进行。

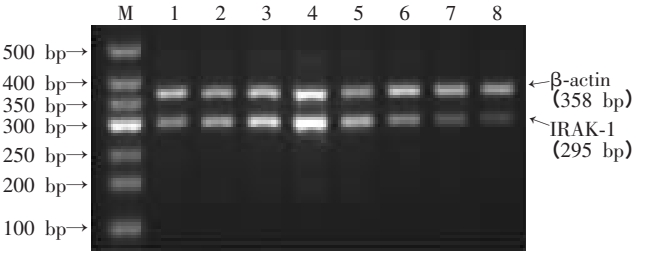
1.3 统计学分析

数据均以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,行单因素方差分析和相关性分析。

2 结果

2.1 缺氧B35细胞IRAK-1 mRNA表达的变化

细胞经3% O_2培养1、3、6、12、24、48、72 h后,RT-PCR结果显示,1 h开始增加,3 h增加明显,6 h达到高峰,12 h维持在较高水平,48 h降至正常水平以下($P<0.05$,图1)。

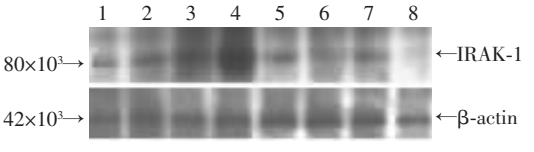


M:DNA标准;1:常氧;2~8:分别为缺氧1、3、6、12、24、48、72 h

图1 RT-PCR检测缺氧后不同时间点B35细胞IRAK-1 mRNA的表达

2.2 缺氧B35细胞IRAK-1蛋白表达的变化

细胞经3% O_2培养1、3、6、12、24、48、72 h后,Western blot结果显示,1 h开始增加,3 h增加明显,6 h达到高峰,12 h已开始降低,48 h降至正常水平以下($P<0.05$,图2)。



1:常氧;2~8:分别为缺氧1、3、6、12、24、48、72 h

图2 Western blot检测缺氧后不同时间点B35细胞IRAK-1蛋白的表达

2.3 IRAK-1在细胞内的分布及荧光表达变化

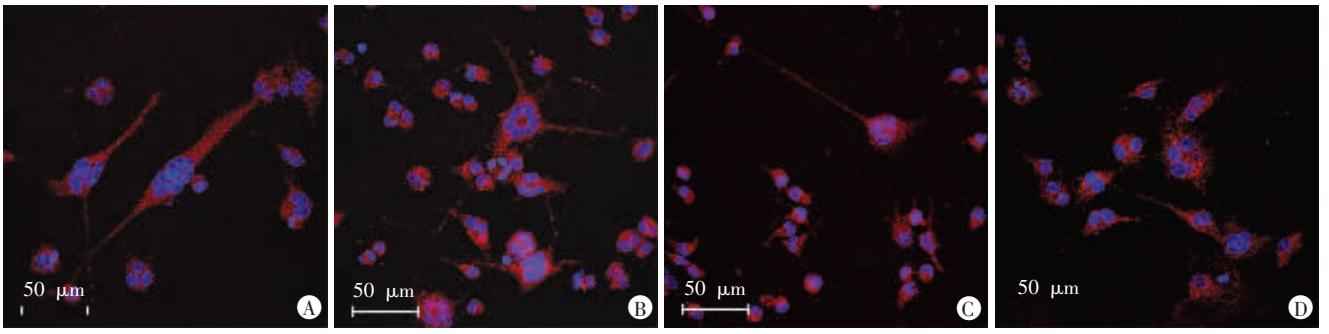
正常B35细胞内存在IRAK-1的表达,主要分布于细胞质,细胞核中也有少量分布。缺氧条件下IRAK-1的特异性荧光强度随缺氧时间延长而增强,但缺氧24 h后荧光强度又降低(图3)。

2.4 缺氧对培养上清液TNF-α含量的影响

ELISA结果显示,缺氧1 h TNF-α含量明显增加(180.705±4.590)pg/ml,6 h达到高峰(232.390±7.532)pg/ml,以后逐渐降低,缺氧72 h降至(182.062±7.069)pg/ml,但始终高于正常水平(162.691±5.321)pg/ml($P<0.05$)。

2.5 IRAK-1蛋白与TNF-α表达水平的相关性

经相关分析,IRAK-1蛋白表达与培养液上清中TNF-α表达水平显著正相关($r=0.88$,$P<0.05$)。



A:常氧;B:缺氧6 h;C:缺氧12 h;D:缺氧24 h

图3 激光共聚焦显微镜观察B35细胞中不同缺氧时间IRAK-1的表达 (免疫荧光)

3 讨论

IRAK-1作为IRAKs家族成员,已被证明激活后可引发一系列慢性炎症反应和自身免疫性疾病。机体在受到病原微生物感染及缺氧等应激时,IRAKs家族被激活,在IRAK-4的诱导下IRAK-1发生磷酸化,与肿瘤坏死因子受体相关因子-6形成复合物,最终激活核转录因子NF-κB等,导致IL-1β、IL-6、TNF-α等一系列炎症细胞因子的转录和表达,并形成所谓"瀑布效应",造成组织的炎症损伤甚至是致死性疾病[3]。文献[4]报道,小鼠在IRAK-1基因完全敲除后,能够明显降低脂多糖诱发的脓毒血症及革兰阴性菌感染引起的免疫应答,下调脾脏细胞的IL-6、TNF-α表达水平;临床研究也发现IRAK-1水平降低的脓毒血症患者,其发生感染性休克的概率及死亡率也相应明显降低[5];另有研究表明,IRAK-1表达与血清中C反应蛋白水平呈正相关,为临床罹患高血压和糖尿病的危险因子之一[6]。可见IRAK-1与炎症性疾病的发生发展密切相关。

中枢神经系统氧供要求高,对缺氧十分敏感,因而更易受到损伤,导致神经元凋亡和坏死,引起相应功能障碍[1]。IRAK-1作为炎症损伤启动因子,有可能在中枢神经系统缺氧过程中发挥着重要作用。但是,目前国内外学者对IRAK-1参与炎症启动和信号转导的研究多局限在外周组织器官和外周血免疫细胞等[3],尽管也有报道IRAK-1在脑中的表达情况[7],但缺乏相关机制以及生理和病理条件下的表达规律研究。本实验利用体外培养的神经元模型,去除循环、体液等因素的影响[8],在细胞水平上证明中枢神经元内存在TLR/IL-1R家族信号系统的关键因子IRAK-1,主要表达在细胞质中,细胞核中也有少量分布。缺氧条件可诱导IRAK-1 mRNA表达上调,1 h即增加,3 h进一步升高,6 h达到高峰,12 h仍维持在较高水平($P<0.05$),24 h后降至正常水平以下($P>0.05$),48 h以后表达进一步降低($P<0.05$);Western blot结果表明,IRAK-1蛋白表达与mRNA表达呈现出相同的变化趋势。激光共聚焦结果也显示IRAK-1表达的荧光强度随缺氧时间的延长而逐渐增强,但24 h后又逐渐减弱。上述结果表明神经元在缺氧后自身能够通过IRAK-1的活化,在1 h之后迅速启动炎症反应,并持续12 h以上,导致中枢神经系统的损伤。Deng等[9]通过对IRAK-1基因完全敲除的小鼠脑脊髓膜炎模型研究表明,中枢神经系统只能产生轻微的炎症反应。一些神经系统慢性炎症性疾病如阿尔兹海默病及帕金森病中均也伴随着IRAK-1表达的升高[7]。这些结果亦表明IRAK-1在中枢神经系统炎症反应中发挥作用。

缺氧条件可促进某些细胞因子释放增多,如IL-1β、IL-6、TNF-α等,在正常生理条件下这些细胞因子参与机体的生长发育和维持内环境稳定,分泌量较低;而在炎症、创伤等刺激下分泌增加[10-12]。既往研究表明[10],TNF-α作为一种具有多种生物活性的细胞因子,可激活细胞因子网络系统,在炎症诱发机制中发挥重要作用,其在神经元中存在生理性表达,并在炎症情况下显著上升。本研究结果显示,在缺氧诱导条件下,神经元分泌TNF-α水平伴随着IRAK-1表达增加而相应上升,与IRAK-1表达密切相关($r=0.88$, $P<0.05$),并且在IRAK-1表达下降后,TNF-α在一段时间内仍维持在较高水平,可能伴随了炎症反应的整个过程,以上结果有力证明了作为脑内主要功能细胞的神经元,可以通过IRAK-1表达上调促进下游TNF-α等细胞因子的释放,参与中枢神经系统炎症反应的调控。

综上所述,我们认为中枢神经元内存在TLR/IL-1R家族信号转导系统及其关键因子IRAK-1,缺氧环境可诱导其表达量明显增加,并通过调控TNF-α分泌参与炎症反应。这为阐明缺氧、缺血性脑病的发病机制,探讨其治疗方法提供实验基础。但是,缺氧环境下参与调控大鼠神经元IRAK-1表达的具体分子机制尚不清楚,有待于今后实验的进一步研究。

参考文献:

[1] 赵延东, 程赛宇, 张金海, 等. 低压缺氧对大鼠海马CA1区神经

元P2X受体表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(23): 2302-2305.
[2] Cao Z, Henzel W J, Gao X. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor[J]. Science, 1996, 271(5252): 1128-1131.
[3] Gottipati S, Rao N L, Fung-Leung W P. IRAK1: a critical signaling mediator of innate immunity[J]. Cell Signal, 2008, 20(2): 269-276.
[4] Thomas J A, Allen J L, Tsen M, *et al*. Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase[J]. J Immunol, 1999, 163(2): 978-984.
[5] Arcaroli J, Silva E, Maloney J P, *et al*. Variant IRAK-1 haplotype is associated with increased nuclear factor-kappaB activation and worse outcomes in sepsis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 173(12): 1335-1341.
[6] Lakoski S G, Li L, Langefeld C D, *et al*. The association between innate immunity gene (IRAK1) and C-reactive protein in the Diabetes Heart Study[J]. Exp Mol Pathol, 2007, 82(3): 280-283.
[7] 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.
[8] 藏林泉, 苏兴文, 邱鹏新, 等. 一种神经元体外缺氧诱导凋亡模型的建立[J]. 中国病理生理学杂志, 2007, 23(6): 1244-1245, 1248.
[9] Deng C, Radu C, Diab A, *et al*. IL-1 receptor-associated kinase 1 regulates susceptibility to organ-specific autoimmunity[J]. J Immunol, 2003, 170(6): 2833-2842.
[10] Janelsins M C, Mastrangelo M A, Park K M, *et al*. Chronic neuron-specific tumor necrosis factor-alpha expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice[J]. Am J Pathol, 2008, 173(6): 1768-1782.
[11] Miller R J, Jung H, Bhangoo S K, *et al*. Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function[J]. Handb Exp Pharmacol, 2009, (194): 417-449.
[12] 韦澈, 周继红, 徐建洪, 等. 冲击伤复合缺氧后大鼠血清TNF-α与IL-8含量的变化[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(23): 2233-2235.

(**收稿**:2009-11-26;**修回**:2010-01-13)
(编辑 王小寒)

文章编号:1000-5404(2010)08-0797-01

个案与短篇

超声诊断右旋心合并复杂心血管畸形1例

郑光美[1],朱方成[2],白 姣[1],景红霞[1],杨 波[1] (442000 湖北 十堰,郧阳医学院:附属人民医院超声科[1],法医学教研室[2])

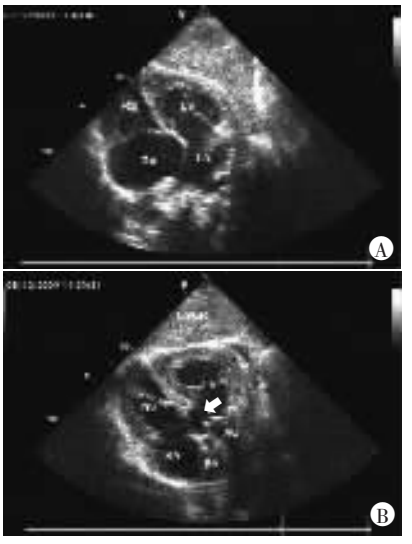
[关键词] 超声心动图;先天性心脏病;右旋心;大动脉异位
[中图法分类号] R541.104 **[文献标志码]** B

复杂先心病的准确诊断有助于手术时机及适应证的把握和手术方式的确立,本研究将1例罕见的右旋心合并大动脉异位并成功实施手术的患者报告如下。

1 临床资料

患者,女性,41岁,因全身酸痛,咽部不适1周,心悸4 d入院,以"急性上感"于2009年12月收入我院呼吸内科,完善相关检查时发现复杂先心病,遂转入我院心胸外科接受手术治疗。查体:唇无发绀,咽充血,双肺未闻及干湿性啰音。胸廓对称,心前区无隆起,心尖搏动弥散,心尖搏动位于右第5肋间锁骨中线内1 cm;心前区可触及收缩期震颤;心浊音界向右扩大;各瓣膜听诊区可闻及3/6级收缩期粗糙杂音,向腋下及后背传导。多层螺旋CT表现:双肺实质内未见异常密度影,所见气管及支气管未见明显变形及狭窄,纵隔居中,心脏增大,右房增大明显,右下肺动脉主干增粗。诊断:心脏增大,右下肺动脉主干增粗。ECG:阵发性室上速,异常QRS波,ST-T改变。血气分析:$p(CO_2)$20.8 mmHg,$p(O_2)$54.4 mmHg,氧饱和度80%。

超声所见(图1):心脏大部位于右侧胸腔,心尖朝右,心房正位,心室右袢。右房明显增大,房间隔膨向左房。室间隔上部见20 mm连续中断。中断处见左向右分流血流信号。大动脉位置关系异常,主动脉起自左室,位于左前,内径34 mm。肺动脉位于右后,骑跨于室间隔,骑跨率约40%,肺动脉瓣开放受限,瓣环内径14 mm,至瓣上16 mm处肺动脉干均狭窄,最窄处内径约10 mm,近分叉处(内径36 mm)及左右肺动脉(左肺动脉19 mm,右肺动脉23 mm)明显扩张。诊断:先天性心脏病:右旋心,室间隔缺损,大动脉异位,肺动脉骑跨,肺动脉狭窄,心包少量积液。



LA:左房; LV:左室; RA:右房; RV:右室; AO:主动脉; PA:肺动脉; LIVER:肝脏
A:剑下四腔心切面显示右侧房室瓣附着点稍低于左侧;B:剑下切面显示心尖朝向右侧肝脏,巨大室间隔缺损(⬆)

图1 右旋心合并复杂心血管畸形患者超声心动图表现

[通信作者] 白 姣,电话:(0719)8637285, E-mail: baijiao2007@yahoo.com.cn

(下转801页)