文章编号:1000-5404(2011)14-1455-03

论著

X盒结合蛋白1对脂多糖处理的Kupffer细胞炎性因子表达的影响

李铁军[1],刘作金[2],李生伟[2],刘长安[2],屈 谦[3],薛 强[2],龚建平[2] (400700 重庆,重庆市第九人民医院普外科[1];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肝胆外科[2];401147 重庆,重庆市卫生局[3])

[摘要] **目的** 探讨X盒结合蛋白1(X-box binding protein 1,XBP1)对脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)处理的Kupffer细胞(Kupffer cells,KCs) TNF-α表达的影响。**方法** 将BALB/c小鼠KCs随机区组法分为质粒组、阴性组和空白组。分别给予XBP1-shRNA、空白质粒转染和空白处理,并给予LPS。免疫细胞化学(SABC法)、Real-time PCR和Western blot法检测各组KCs中XBP1基因及蛋白表达水平;酶联免疫吸附法(ELISA)检测核因子NF-κB活性及培养上清液中TNF-α含量。**结果** 与阴性组、空白组相比,质粒组XBP1及下游因子TNF-α表达明显降低($P<0.05$);而阴性组、空白组间比较比较无明显差异($P>0.05$)。3组间NF-κB活性比较无明显差异($P>0.05$)。**结论** XBP1-shRNA质粒能明显抑制KCs XBP1基因的表达,并通过非NF-κB通路减少其下游因子TNF-α的释放。

[关键词] X盒结合蛋白1;Kupffer细胞;肿瘤坏死因子-α;小鼠
[中图法分类号] R322.47;R341;R329.28 [文献标志码] A

Influence of X-box binding protein 1 on expression of inflammatory factor in lipopolysacharide-induced Kupffer cells

Li Tiejun[1], Liu Zuojin[2], Li Shengwei[2], Liu Chang'an[2], Qu Qian[3], Xue Qiang[2], Gong Jianping[2] ([1]Department of General Surgery, Ninth People's Hospital, Chongqing, 400700; [2]Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [3]Chongqing Municipal Health Bureau, Chongqing, 401147, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the influence of X-box binding protein 1 (XBP1) on the expression of inflammatory factor of lipopolysaccharide (LPS)-induced Kupffer cells (KCs). **Methods** KCs derived from BALB/c mice were randomly divided into an XBP1-shRNA group, a negative control group and a blank control group, which received XBP1-shRNA plasmid transfection, control vector transfection and no treatment, respectively. Then the three groups were all treated with LPS. The mRNA and protein expression of XBP1 in KCs was determined by Real-time PCR, Western blotting and immunohistochemistry. The activity of NF-κB and the density of TNF-α in the supernatant of coculture were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The expression of XBP1 and its downstream factor TNF-α was significantly lower than that in the negative control group and blank control group ($P<0.05$). However, there was no significant difference between the two control groups ($P>0.05$). In addition, the activity of NF-κB in the three groups had no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion** XBP1-shRNA plasmid can significantly inhibit the expression of XBP1 gene and reduce the release of its downstream factor TNF-α without changing the activity of NF-κB in KCs.

[**Key words**] X-box binding protein 1;Kupffer cells;TNF-α;mice

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30801126). Corresponding author:Xue Qiang, E-mail:kevin9999992009@hotmail.com

内毒素或脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)主要通过与单核-巨噬细胞表面的LPS受体结合,经一系列信号传导诱生大量炎症介质如肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)释放而造成机体损害[1-2]。X盒结合蛋白1(X-box binding protein 1,XBP1)是一种碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper,bZIP)结构蛋白。最新研究表明,在巨噬细胞中XBP1可以直接调控TNF-α的表达[3-5]。因此,本研究拟通过观察LPS诱导后小鼠肝脏Kupffer细胞(Kupffer cells,KCs)中XBP1表达的变化及其对TNF-α活性的影响,试图证明XBP1的活化是产生TNF-α的关键因素之一,以期为重要炎性介质TNF-α的调控提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性健康BALB/c小鼠,10只,8~10周龄,体质量19~21 g,购自重庆医科大学实验动物中心;Ⅳ型胶原酶及Percoll

[基金项目] 国家自然科学基金(30772098)
[通信作者] 薛 强,E-mail:kevin9999992009@hotmail.com

细胞分离液购自 Sigma 公司;小鼠 XBP1 短发夹 RNA(shRNA)质粒及空白质粒由 Santa Cruz 公司合成;LPS(大肠埃希菌 O111:B4)购自 Sigma 公司;实时定量聚合酶链反应(Real-time PCR)试剂盒及总 RNA 提取试剂盒购自 Promega;兔抗小鼠 XBP1 多克隆抗体购自美国 Imgenex 公司;核蛋白抽提试剂盒、TNF-α 酶联免疫吸附(ELISA)测定试剂盒购自 Active motif 公司。

1.2 表达 XBP1-shRNA 的载体质粒构建

根据 siRNA 序列 5′-GAGTCAAACTAACGTGGTA-3′[6],交由上海生工公司合成,按照 5′→3′分别为 *Age* Ⅰ酶切位点 + 靶向正义链 + 发夹状结构 + 靶向反义链 + 终止序列 + *Eco*R Ⅰ酶切位点。将正反 2 条寡核苷酸链退火后得到双链 DNA,定向插入经 *Age* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ酶切的转录载体 pGenesil-1 进行连接,得到表达质粒 pSIXBP1。将 10 μg/μl 的 pSIXBP1,按 0.5 μl 的 siRNA:0.55 μl 的 TOP easy:0.45 μl 不含 RNA 酶的无菌水的比例混合后,室温下温育 30 min,形成 pSIXBP1-TOP easy 转染复合物备用。

1.3 Kupffer 细胞分离纯化

阻断 BALB/c 小鼠肝上下腔静脉,经门静脉插管,肝脏原位循环灌注 0.05% Ⅳ型胶原酶,灌注液由肝下下腔静脉插管引出,循环灌注约 20 min,切下肝脏移入超净台,释放肝细胞悬液,Hanks 液终止消化。200 目过滤网过滤,加入 20 ml RPMI 1640 制成混合细胞悬液,于 4 ℃、70 × *g* 离心 3 min 后将肝实质细胞与非实质细胞分开。将含非实质细胞的细胞悬液,4 ℃、650 × *g* 离心 7 min 后弃上清液,加入含 50%:25% 梯度的Percoll 细胞分离液中,4 ℃、1 500 × *g* 离心 10 min,25% 与 50% Percoll 细胞分离液之间为 KCs 悬液。收集 KCs 悬液,用 RPMI 1640 洗涤 3 次,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,接种于培养瓶。2 h 后,洗去非贴壁细胞,台盼蓝染色,判断细胞活率为 95%。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基调整细胞密度为 5×10^5/ml,接种于 24 孔板,每孔 1 ml,于 37 ℃、5% CO_2,孵箱中培养。

1.4 质粒转染及 LPS 处理

将上述 KCs 培养 24 h 后,随机区组法分为 XBP1-shRNA 质粒转染组(质粒组),阴性对照组(阴性组)和空白对照组(空白组)。转染前 1 d,取细胞铺于 24 孔板,每孔 1 ml DMEM 完全培养基含 1×10^6 个细胞,次日,细胞生长融合度达 95%。转染时按质粒说明书及脂质体 Lipofectamine 2000 说明书分别进行 XBP1-shRNA 质粒和空质粒转染操作(空白组不予处理)。转染后的 KCs 和空白组的 KCs 用无抗生素的完全培养基继续培养 24 h。弃去原培养基,加入新鲜培养基 1 ml,并加入 LPS 100 μg/L,继续培养 3 h[7],收集标本备检。

1.5 免疫细胞化学

采用免疫细胞化学(SABC 法)进行检测,具体方法按照说明书进行。结果判定:光学显微镜下观察,XBP1 阳性细胞为胞核内棕色或棕褐色颗粒。在 400 倍光镜下,用 HPIAS-1000 型医学彩色图像分析系统测量光密度值,每组各取 10 张片,每张切片取 2 个视野,分别测量,然后计算光密度值的均值作为此组的代表值。

1.6 XBP1 mRNA 及蛋白表达水平检测

Real-time PCR 测定各组肝脏 XBP1 mRNA 表达水平。PCR 引物:XBP1 上游引物 5′-TCCGCAGCACTCAGACTAC-3′,下游引物 5′-GTTCCTCCAGATTAGCAGACTC-3′,扩增产物为 198 bp;内参照 β-actin 上游引物 5′-GGTATGGAATCCTGTGGCAAT-3′,下游引物 5′-GTCCGCCTAGAAGCATT-3′,扩增产物为 452 bp。反转录后行实时荧光定量 PCR。mRNA 相对表达量:$2^{-\triangle Ct} \times 100\%$。△Ct = 目标基因 Ct 值 − 内参 Ct 值。Western blot 法测定各组 XBP1 蛋白表达水平。Western blot 产物电泳条带,采用美国 Bio-Rad 公司 Quantity One 4.0 图像分析软件行扫描分析。XBP1 mRNA 相对表达抑制率采用公式计算。

抑制率 = [1 −(转染组 XBP1 条带灰度/转染组 β-actin 条带灰度)/(空白组 XBP1 条带灰度/空白组 β-actin 条带灰度)] × 100%

1.7 NF-κB 活性测定

用 ELISA 检测 NF-κB 活性。提取不同时相的细胞核蛋白,经蛋白质定量后,将核蛋白按 5 μg/孔加入预先处理的 96 孔酶联板(已包被含 NF-κB 结合位点的寡聚核苷酸),置入 100 r/min 低速摇床室温孵育 1 h;用 200 μl/孔清洗缓冲液洗涤 3 次,加入 100 μl/孔 1:1 000 的抗 NF-κB P65 亚单位的抗体,静置、室温孵育 1 h;洗涤 3 次,再加入 100 μl/孔 1:1 000 的辣根过氧化物酶标记的第 2 抗体,静置、室温孵育 1 h;加入 100 μl/孔显色液,避光反应 10 min,再加入 100 μl/孔终止液(0.5 mol/L H_2SO_4),5 min 内于波长 450 nm 处检测光密度值[*D*(450)]。以 NF-κB 野生型及突变型寡核苷酸同源序列为对照。用 Image Master VDS Soft 软件分析结果。

1.8 共培养上清液 TNF-α 检测

酶联免疫吸附法(ELISA)检测共培养上清液中 TNF-α 含量。按照 ELISA 试剂盒说明书,对上述 3 组共培养上清液样本分别进行稀释,在反应板中孵育 1 h 后,再分别按顺序加入各种工作液孵育。加入终止液后,在 5 min 内于 492 nm 处测光密度值[*D*(492)],根据标准曲线确定 TNF-α 含量。

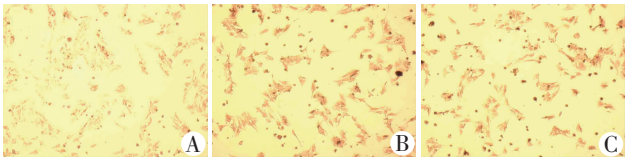
1.9 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件对各组资料进行独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 免疫细胞化学染色结果

光镜下观察 XBP1 阳性细胞为细胞核内棕色或棕褐色颗粒(图 1)。用图像分析软件计算平均光密度(average optical density,AOD)显示,质粒组 XBP1 表达水平为(0.21 ± 0.04),明显低于阴性组(0.47 ± 0.07)和空白组(0.43 ± 0.06)($P < 0.05$)。而阴性组和空白组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。



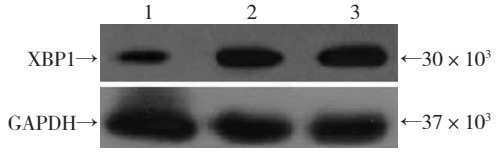
A:质粒组;B:阴性组;C:空白组

图 1 XBP1-shRNA 质粒转染对 XBP1 表达的影响 (HE ×400)

2.2 XBP1-shRNA 质粒转染对 XBP1 mRNA 及蛋白表达水平的影响

Real-time PCR 及 Western blot 实验结果显示,XBP1-shRNA 质粒能明显抑制 KCs 内 XBP1 表达($P < 0.05$),XBP1 mRNA 表达水平在质粒组、阴性组和空白组分别为(0.12 ± 0.03)、(0.33 ± 0.07)、(0.37 ± 0.07)(沉默效率为 68.6%),蛋白表达水平为

(0.41 ± 0.08)、(0.73 ± 0.16)、(0.78 ± 0.19)。质粒组 XBP1 mRNA 及蛋白表达水平明显低于阴性组和空白组($P<0.05$),而阴性组和空白组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。见图2。



1:质粒组; 2:阴性组; 3:空白组

图2 XBP1-shRNA 质粒转染对 XBP1 蛋白表达水平的影响

2.3 XBP1-shRNA 质粒转染对 NF-κB 活性的影响

ELISA 实验结果表明:质粒组、阴性组和空白组 NF-κB 活性分别为(0.76 ± 0.12)、(0.84 ± 0.18)和(0.89 ± 0.21)。3 组之间无统计学差异($P>0.05$)。

2.4 XBP1-shRNA 质粒转染对上清液 TNF-α 的影响

共培养上清液 ELISA 实验结果显示,质粒组共培养上清液中 TNF-α 含量为(563.92 ± 46.56) pg/ml,明显低于阴性组[(1 258.42 ± 103.57) pg/ml)与空白组[(1 302.31 ± 120.33) pg/ml](P<0.05),两对照组间差异无统计学意义($P>0.05$)。说明质粒组 TNF-α 表达受到明显抑制。

3 讨论

KCs 占全身巨噬细胞总数的 80% ~90%,是体内最大的巨噬细胞群,主要定居于肝脏,是肝脏抵抗来自胃肠道的感染源性、免疫源性和毒性物质的主要屏障,同时也是内毒素的主要靶细胞[8]。以往研究表明[2,9-10],LPS 主要与结合巨噬细胞上的 LPS 膜受体 CD14 及跨膜蛋白 Toll 样受体-4(Toll-like receptor-4, TLR-4)相结合,TLR-4 胞内段与髓性分化蛋白-88(myeloid differentiation primary responseprotein-88, MyD88)的 TLR 结构域相作用,招募白细胞介素-1 受体相关激酶-4(interleukin 1 receptor associated kinase-4, IRAK-4)到 TLR-4 形成的复合物上,最终启动核转录因子 NF-κB,导致 TNF-α 等一系列炎症细胞因子的转录和表达,通过抑制 NF-κB 的活性可以在一定程度抑制 TNF-α 的表达,减轻炎症反应,但仍有一定量 TNF-α 的表达。

XBP1 属于 CREB/ATF(cyclic AMP response element binding protein/activating transcription factor)蛋白家族,在肝组织中高表达,其基因对肝细胞的分化、心肌细胞的存活及浆细胞的分化起着重要作用[11]。本研究表明,通过质粒转染能明显抑制 KCs 细胞 XBP1 的表达,而 XBP1 基因的沉默可以明显减少下游因子 TNF-α 的含量。但是,我们实验结果表明,核转录因子 NF-κB 在 3 组之间表达无明显差异,这表明 XBP1 并不是通过作用于 NF-κB 而抑制 TNF-α 的转录,而是通过独立的信号通路直接对 TNF-α 进行作用,具体分子机制可能为:LPS 与巨噬细胞膜受体 CD14 结合后,通过 TLR-4 导致 TRAF6 发生低聚作用,激活肌醇蛋白 α(inositol requiring α, IRE1α)细胞质的蛋白激酶域,进而发生自身磷酸化作用,对 XBP1 特定的内含子和外显子域进行切割,产生具有高度转录活性的 XBP1,被激活后的 XBP1 被大量招募在 TNF-α 等炎症介质基因的启动子上,活化 TNF-α 基因的转录和表达[12-14]。

本实验结果提示,以 XBP1 为靶点,shRNA 转染途径能有效抑制 XBP1 的表达,通过对 XBP1 基因的沉默能显著减少 TNF-α 的含量,通过 XBP1 靶点调控 TNF-α 表达水平可以避免损伤 NF-κB 的基础活性。但在活体中是否能通过 XBP1 的抑制在一定程度上减少 TNF-α 释放从而减轻内毒素血症尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 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.

[2] 李生伟, 刘作金, 刘长安, 等. 库普弗细胞内毒素耐受时白细胞介素-1 受体相关激酶-4 的表达变化[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(2): 97 - 100.

[3] Martinon F, Chen X, Lee A H, *et al*. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages [J]. Nat Immunol, 2010, 11(5): 411 - 418.

[4] Liu Y, Adachi M, Zhao S, *et al*. Preventing oxidative stress: a new role for XBP1[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(6): 847 - 857.

[5] Glimcher L H. XBP1: the last two decades[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(Suppl 1): i67 - i71.

[6] 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]. 现代生物医学进展, 2009, 9(8): 1401 - 1404.

[7] Liu Z J, Yan L N, Li X H, *et al*. Up-regulation of IRAK-M is essential for endotoxin tolerance induced by a low dose of lipopolysaccharide in Kupffer cells [J]. J Surg Res, 2008, 150(1): 34 - 39.

[8] Sturm E, Havinga R, Baller J F, *et al*. Kupffer cell depletion with liposomal clodronate prevents suppression of Ntcp expression in endotoxin-treated rats[J]. J Hepatol, 2005, 42(1): 102 - 109.

[9] Li X H, Gong J P, Shi Y J, *et al*. *In vitro* expression of CD14 protein and its gene in Kupffer cells induced by lipopolysaccharide[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2003, 2(4): 571 - 575.

[10] 涂兵, 梁绍勇, 陈勇, 等. Kupffer 细胞 Fas 配体的表达及其对移植肝内淋巴细胞的杀伤作用[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(14): 1322 - 1326.

[11] Guo F, Song F, Zhang J, *et al*. Study of transcription activity of X-box binding protein 1 gene in human different cell lines[J]. J Genet Genomics, 2007, 34(9): 790 - 798.

[12] Sha H, He Y, Chen H, *et al*. The IRE1 alpha-XBP1 pathway of the unfolded protein response is required for adipogenesis [J]. Cell Metab, 2009, 9(6): 556 - 564.

[13] Engel A, Barton G M. Unfolding new roles for XBP1 in immunity [J]. Nat Immunol, 2010, 11(5): 365 - 367.

[14] Kaser A, Blumberg R S. Survive an innate immune response through XBP1[J]. Cell Res, 2010, 20(5): 506 - 507.

(**收稿**:2011-01-06;**修回**:2011-03-20)

(编辑 吴培红)