DOI:10.16016/j.1000-5404.201909198

2019 年度重庆市出版专项资金资助栏目论文

DUSP1 在缺氧 RAW264.7 细胞中的表达及其对炎症免疫反应的调控作用

董华平,刘 宝,张二龙,高钰琪 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)高原军事医学系高原特需药品与器材研究室,极端环境医学教育部重点实验室,全军高原医学重点实验室

[**摘要**] **目的** 探讨双特异性磷酸酶 1(dual specificity phosphatase-1, DUSP1)在缺氧小鼠 RAW264.7 巨噬细胞中的表达情况及其在缺氧诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症免疫反应中的调控作用。**方法** 将 RAW264.7 细胞分别在缺氧(1%O_2)条件下培养不同时间(12、24 和 36 h),常氧组在常氧(21%O_2)条件下培养;采用 RNA 干扰技术干扰 RAW264.7 细胞中 *Dusp*1 表达并进行缺氧暴露 24 h。收集各对应时间点细胞培养上清液和细胞标本,提取细胞总 RNA 和总蛋白。使用 qRT-PCR 检测 *Dusp*1、*Il1b*、*Il*10 和 *Tnfa* 的 mRNA 表达,采用 Western blot 检测 DUSP1 的蛋白表达,采用 ELISA 检测细胞培养上清液中 IL-1β、IL-10 和 TNF-α 的分泌水平。**结果** 与常氧组(缺氧 0 h)相比,缺氧暴露后 RAW264.7 细胞中 DUSP1 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$),蛋白表达在缺氧暴露 24 h 时达到峰值;缺氧暴露 24 h 和 36 h *Il1b*、*Il*10 mRNA 表达均显著升高($P<0.05$);缺氧暴露 12 h 时 *Tnfa* mRNA 表达明显降低($P<0.05$);缺氧暴露 12、24 h 和 36 h RAW264.7 细胞 IL-1β 的分泌水平明显增加($P<0.05$)。与干扰序列对照组相比,干扰 *Dusp*1 表达后,缺氧暴露 24 h RAW264.7 细胞中 IL-1β 的 mRNA 表达和分泌水平明显增加($P<0.05$),IL-10 的分泌水平明显增加($P<0.05$),而 TNF-α 的 mRNA 表达和分泌水平明显降低($P<0.05$)。**结论** 缺氧能够诱导 RAW264.7 巨噬细胞中 DUSP1 表达上调,DUSP1 通过调节 IL-1β、IL-10 和 TNF-α 的表达和/或分泌参与调控缺氧诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症免疫反应。

[**关键词**] DUSP1;缺氧;RAW264.7 细胞;炎症免疫反应

[**中图法分类号**] R345; R364.4; R392.2 [**文献标志码**] A

Expression of dual specificity phosphatase-1 in hypoxic RAW264.7 cells and its role in inflammatory immune response regulation

DONG Huaping, LIU Bao, ZHANG Erlong, GAO Yuqi Institute of Medicine and Equipment for High Altitude Region, Key Laboratory of Extreme Environment Medicine of Ministry of Education, Key Laboratory of High Altitude Medicine of PLA, Faculty of High Altitude Military Medicine, Army Military Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of dual specificity phosphatase-1 (DUSP1) in hypoxic RAW264.7 macrophages and its regulatory role in hypoxia-induced RAW264.7 macrophage inflammatory immune response. **Methods** RAW264.7 macrophages were cultured under a hypoxic condition (1%O_2) for 12, 24 and 36 h, with the cells maintained in routine culture conditions (21%O_2) as control. RNA interference technique was used to inhibit Dusp1 expression in RAW264.7 cells, which were exposed to hypoxia for 24 h following the transfection. The cells and the culture supernatant were collected after the treatments, and the mRNA expression levels of *Dusp*1, *Il1b*, *Il*10 and *Tnfa* were detected using qRT-PCR; and the protein expression of DUSP1 was detected using Western blotting, and the levels of interleukin-1β

[**基金项目**] 国家自然科学基金重点项目(81830062)

[**通信作者**] 高钰琪,E-mail: gaoy66@yahoo.com

(IL-1β), IL-10 and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in the supernatant were determined with ELISA. **Results** Compared with the control cells cultured in normoxic condition, RAW264.7 cells with hypoxic exposures exhibited significantly increased the mRNA and protein levels of DUSP1 ($P<0.05$), whose protein expression reached the peak level at 24 h of hypoxia. The mRNA levels of *Il1b* and *Il10* increased significantly after hypoxic exposure for 24 and 36 h ($P<0.05$), and the expression of Tnfa mRNA reduced significantly after a 12-h exposure ($P<0.05$). Hypoxic exposure caused a significant increase in the secretion level of IL-1β by the macrophages ($P<0.05$). Transfection with si-*Dusp*1 significantly increased the mRNA expression of *Il1b* and the secretion levels of IL-1β and IL-10 and significantly lowered the mRNA expression and secretion level of TNF-α in hypoxic RAW264.7 cells (all $P<0.05$). **Conclusion** Hypoxia can up-regulate DUSP1 expression in RAW264.7 macrophages. DUSP1 participates in the regulation of hypoxia-induced RAW264.7 macrophage inflammatory immune response by modulating the expression and the secretion of IL-1β, IL-10 and TNF-α.

[**Key words**] dual specificity phosphatase-1; hypoxia; RAW264.7 cells; inflammatory immune response

Supported by the Key Project of National Natural Science Foundation of China (81830062). Corresponding author: GAO Yuqi, E-mail: gaoy66@yahoo.com

缺氧是常见的病理过程,通常由氧供不足或组织细胞氧利用障碍引发。巨噬细胞是一种重要的固有免疫细胞,广泛存在于机体不同的器官组织中,执行多种不同的功能,包括对抗入侵的病原体和肿瘤细胞、协调伤口愈合、参与获得性免疫应答中抗原提呈等[1]。巨噬细胞对缺氧十分敏感,被激活的巨噬细胞可通过表达和分泌某些炎症细胞因子和趋化因子,活化和招募其他炎症细胞,进而参与缺氧区域的组织损伤和重塑[2]。缺氧诱导的巨噬细胞炎症反应在多种临床疾病如缺氧性肺动脉高压、代谢综合征等的发生发展中发挥了重要作用[3-6]。因此,探讨缺氧诱导的巨噬细胞炎症反应及其调控机制,对缺氧相关疾病的防治具有重要意义。

双特异性磷酸酶1(dual specificity phosphatase-1, DUSP1),也被称作丝裂素活化蛋白激酶磷酸酶1(mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1),是一种既能去磷酸化酪氨酸,又能去磷酸化苏氨酸的磷酸酶[7]。DUSP1主要催化细胞内已激活的MAPK家族成员(P38、JNK与ERK)中特异性基序TXY磷酸基团的水解,从而抑制它们的活性,进而阻断其下游相关生物学反应[8]。研究显示,DUSP1在TLR配体刺激引起的巨噬细胞炎症免疫反应中发挥着重要的负调控作用[9]。DUSP1是否参与调控缺氧诱导的巨噬细胞炎症反应尚不清楚。我们推测缺氧可能通过上调巨噬细胞中DUSP1的表达,从而防止巨噬细胞过度炎症免疫反应。因此,本研究拟通过观察缺氧处理不同时间RAW264.7巨噬细胞中DUSP1和炎症相关细胞因子IL-1β, IL-10和TNF-α的表达情况,以及下调DUSP1表达对缺氧RAW264.7巨噬细胞中IL-1β, IL-10和TNF-α表达的影响,初步探讨DUSP1在缺氧诱导的巨噬细胞炎症免疫反应中的调控作用,为缺氧诱导的巨噬细胞炎症免疫反应的调控寻找潜在的干预靶点。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料与试剂

小鼠RAW264.7巨噬细胞由陆军军医大学(第三军医大学)生物化学与分子生物学教研室何凤田教授课题组惠赠。高糖DMEM培养基、Opti-MEM培养基均购自Gibco公司。胎牛血清(FBS)购自Hyclone公司。PBS、TBS、封闭蛋白干粉、IL-1β ELISA试剂盒、IL-10 ELISA试剂盒和TNF-α ELISA试剂盒均购自博士德公司。细胞组织快速裂解液(RIPA裂解液)、PMSF、BCA蛋白浓度测定试剂盒、彩色预染蛋白分子量标准、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG和Western一抗二抗去除液(强碱性)等均购自碧云天公司。总RNA提取试剂盒购自Omega公司。反转录试剂盒、SYBR Green购自TaKaRa公司。Lipofectamine RNAiMAX购自Invitrogen公司。PCR引物由Invitrogen公司设计合成(表1)。抗DUSP1抗体(sc-373841)购自Santa公司。抗β-actin抗体(a2228)购自Sigma公司。ECL Plus显色液购自葆光生物。针对*Dusp*1基因的干扰序列及阴性对照为双链RNA,由广州锐博公司设计合成(表2)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与实验处理 RAW264.7细胞在含10%FBS、1%青-链霉素溶液的DMEM高糖培养基中常规培养。每2~3天换液,细胞融合至80%左右,进行传代。在观察缺氧对DUSP1和炎症相关细胞因

子表达的影响时将 RAW264.7 细胞分别在缺氧(1%O_2)条件下培养不同时间(12、24、36 h),常氧(缺氧 0 h)组在常氧(21%O_2)条件下培养。研究干扰 *Dusp*1 表达对缺氧 RAW264.7 细胞炎症相关细胞因子表达的影响时分为两组:干扰序列阴性对照组(NC),干扰序列组(si-*Dusp*1)。细胞转染采用脂质体法。转染前 1 d,接种细胞至 6 孔板,使转染时的细胞密度为 30%~50%。按照试剂说明书进行转染。转染后 24 h 进行细胞换液,然后将细胞置于低氧工作站中缺氧(1%O_2)培养 24 h,随后收集标本。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列(5′→3′)
β-actin	正义:GGCTGTATTCCCCTCCATCG
	反义:CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
*Dusp*1	正义:GTTGTTGGATTGTCGCTCCTT
	反义:TTGGGCACGATATGCTCCAG
Il1b	正义:GCAACTGTTCCTGAACTCAACT
	反义:ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
Tnfa	正义:CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	反义:GCTACGACGTGGGCTACAG
*Il*10	正义:CTTACTGACTGGCATGAGGATCA
	反义:GCAGCTCTAGGAGCATGTGG

表 2 *Dusp*1 基因的干扰序列

编号	靶序列
si-*Dusp*1-001	GCTCCACTCAAGTCTTCTT
si-*Dusp*1-002	GCTTACCTCATGAGGACTA
si-*Dusp*1-003	GCATCACCGCCTTGATCAA

1.2.2 qRT-PCR 按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA。取 2 μg 总 RNA,使用 TaKaRa 公司反转录试剂盒反转录为 cDNA。获得的 cDNA 用 DEPC 水稀释 4 倍。扩增反应体系终体积为 10 μL,包含 SYBR Green 5 μL,上、下游引物各 0.5 μL,cDNA 2.5 μL 和 DEPC 水 1.5 μL,每个样本设 3 个平行复孔。qRT-PCR 反应条件如下:95 ℃,30 s 预变性;95 ℃,5 s;60 ℃,30 s;循环 40 次。以 β-*actin* 为内参,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各基因的相对表达量。

1.2.3 Western blot 检测 用已加入 PMSF 的 RIPA 裂解液裂解细胞,提取各组细胞的总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度。行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(5%浓缩胶,60 V;10%分离胶,100 V)。PVDF 转膜 100 V、1 h。5%封闭蛋白溶液室温封闭 1 h。TBST 漂洗 10 min×2 次后剪膜,放入抗 DUSP1 抗体(1∶1 000)溶液中,4 ℃摇床孵育过夜。TBST 漂洗 10 min × 4 次,将膜转移至辣根酶标山羊抗小鼠抗体(1∶2 000)溶液中,室温孵育 1 h。TBST 漂洗 10 min ×3 次。最后以化学发光法显色,用 Bio-Rad 凝胶成像仪显像。由于 DUSP1 与 β-actin 的相对分子质量接近,因此在 DUSP1 条带显影完成后,使用一抗二抗去除液洗涤膜,然后进行封闭等 Western blot 的后续操作,抗 β-actin 抗体的稀释比例为 1∶2 000,余操作同前。使用 Image J 软件对条带进行灰度值分析,以 DUSP1 与 β-actin 灰度值比值作为 DUSP1 的相对表达量。

1.2.4 ELISA 按照试剂盒说明书稀释标准品,然后将稀释好的标准品及待测样品按 100 μL/孔加入孔中,1 孔只加样品稀释液作为零孔。盖上封板膜,37 ℃反应 90 min,甩去孔中的液体,不洗。然后按 100 μL/孔加入准备好的生物素标记抗体工作液,盖上封板膜,37 ℃反应 60 min。弃去孔中的液体,1×洗涤缓冲液洗涤 3 次,每次浸泡 1 min 左右。然后按 100 μL/孔加入准备好的已在 37 ℃预热 30 min 的 ABC 工作液,盖上封板膜,37 ℃反应 30 min。弃去孔中的液体,1×洗涤缓冲液洗涤 5 次,每次浸泡 1 min 左右。然后按 90 μL/孔加入已在 37 ℃预热 30 min 的 TMB 显色液,盖上封板膜,37 ℃避光反应 20~25 min。待标准品孔出现梯度蓝色后,按 100 μL/孔加入 TMB 终止液,然后用酶标仪在 450 nm 测定 *D* 值。以细胞的总蛋白浓度对检测值进行校正。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20 统计软件。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。实验均独立重复 3 次,两组间比较采用独立样本 *t* 检验;若组内数据偏离较大,不符合正态分布时则使用非参数检验。

2 结果

2.1 缺氧对 RAW264.7 细胞中 DUSP1 表达的影响

采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测缺氧(1%O_2)培养对 RAW264.7 细胞中 DUSP1 mRNA 和蛋白表达的影响。结果显示,与常氧组相比,缺氧暴露 12、24 和 36 h RAW264.7 细胞中 DUSP1 的 mRNA 表达水平和蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$,图 1)。

2.2 缺氧对 RAW264.7 细胞中 *Il1b*、*Il*10 和 *Tnfa* mRNA 表达的影响

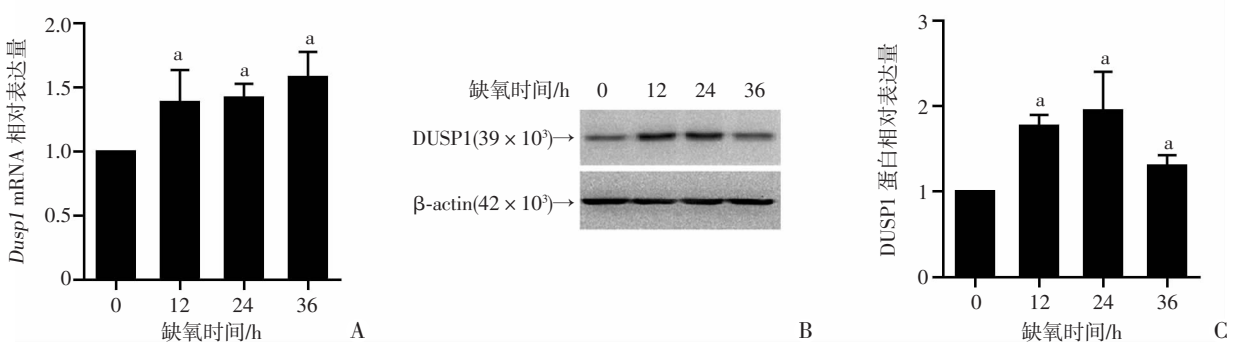
采用 qRT-PCR 检测缺氧(1% O_2)培养对 RAW264.7 细胞中炎症相关细胞因子 *Il1b*、*Il*10 和 *Tnfa* mRNA 表达的影响。与常氧组相比,缺氧暴露 12 h *Il1b*、*Il*10 mRNA 表达无明显变化($P>0.05$,图 2),缺氧暴露 24 和 36 h *Il1b*、*Il*10 mRNA 表达均较常氧组显著升高($P<0.05$,图 2)。与常氧组相比,缺氧暴露 12 h *Tnfa* mRNA 表达明显降低($P<0.05$,图 2),缺氧 24 和 36 h *Tnfa* mRNA 表达无明显变化($P>0.05$,图 2)。

2.3　缺氧对 RAW264.7 细胞 IL-1β、IL-10 和 TNF-α 分泌水平的影响

采用 ELISA 检测缺氧(1%O_2)RAW264.7 细胞培养上清中 IL-1β、IL-10 和 TNF-α 的分泌水平。与常氧组相比,缺氧处理 12、24 和 36 h RAW264.7 细胞 IL-1β 分泌水平明显增加($P<0.05$,图 3)。与常氧组相比,缺氧暴露 12、24 和 36 h RAW264.7 细胞 IL-10 和 TNF-α 的分泌水平无明显变化($P>0.05$,图 3)。

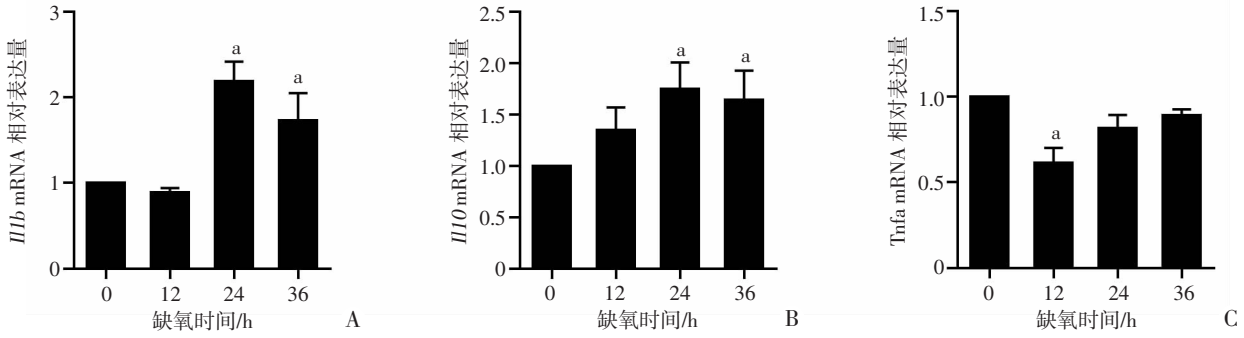
2.4　DUSP1 对缺氧 RAW264.7 细胞中 *Il1b*、*Il10* 和 *Tnfa* mRNA 表达的影响

转染编号为 si-*Dusp*1-001 和 si-*Dusp*1-003 的干扰序列能够显著降低缺氧 RAW264.7 细胞中 DUSP1 的 mRNA 和蛋白表达($P<0.05$,图 4)。干扰 *Dusp*1 表达后,与干扰序列对照组相比,缺氧暴露 24 h 后 RAW264.7 细胞中 *Il1b* mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$,图 5),*Il10* mRNA 表达水平无明显改变($P>0.05$,图 5),而 *Tnfa* mRNA 表达水平明显降低($P<0.05$,图 5)。



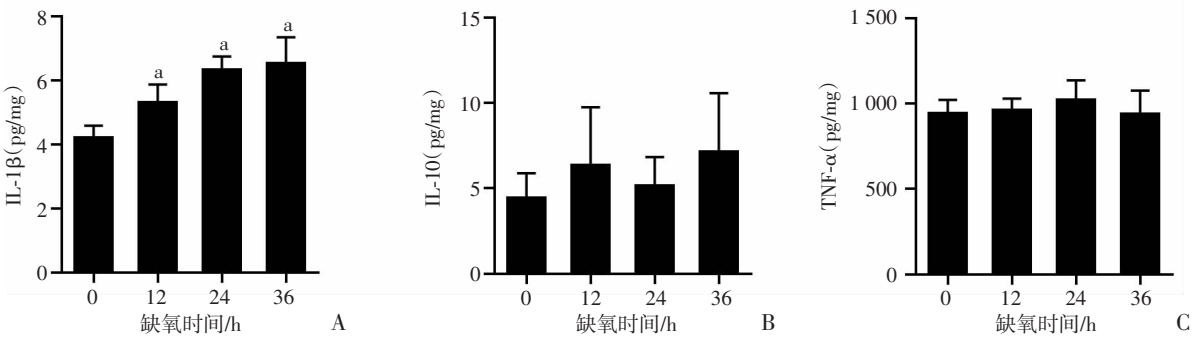
A:qRT-PCR 检测 *Dusp*1 mRNA 表达水平; B、C: Western blot 检测 DUSP1 蛋白表达水平; a: $P<0.05$,与常氧组(缺氧 0 h)比较

图 1　缺氧上调 RAW264.7 细胞中 DUSP1 的表达　($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



A: *Il1b*; B: *Il10*; C: *Tnfa* mRNA;a:$P<0.05$,与常氧组(缺氧 0 h)比较

图 2　缺氧对 RAW264.7 细胞中 *Il1b*、*Il10* 和 *Tnfa* mRNA 表达的影响　($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



A: IL-1β;B:IL-10;C:TNF-α;a:$P<0.05$,与常氧组(缺氧 0 h)比较

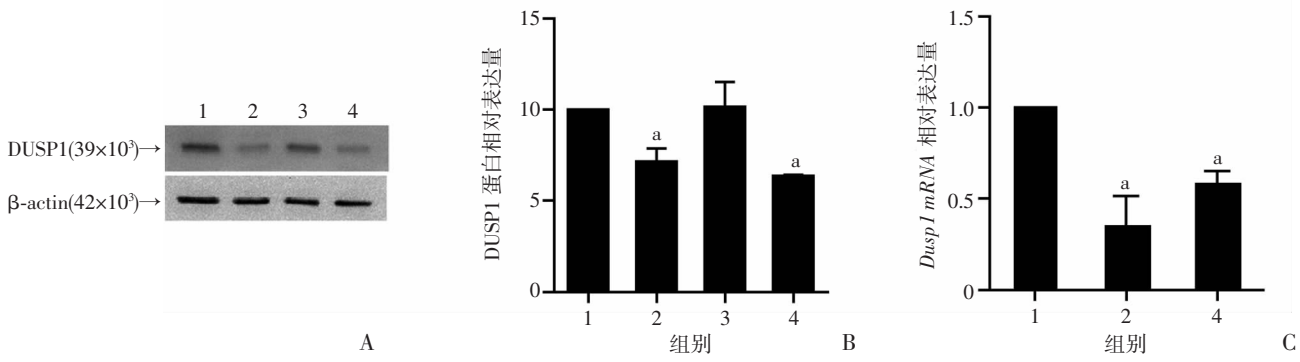
图 3　缺氧对 RAW264.7 细胞 IL-1β、IL-10 和 TNF-α 分泌水平的影响　($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.5 DUSP1 对缺氧 RAW264.7 细胞 IL-1β、IL-10 和 TNF-α 分泌水平的影响

采用 ELISA 检测转染 si-*Dusp*1 后缺氧 RAW264.7 细胞培养上清中 IL-1β、IL-10 和 TNF-α 的分泌水平。干扰 *Dusp*1 表达后,缺氧暴露 24 h 后 RAW264.7 细胞 IL-1β 和 IL-10 的分泌水平较干扰序列对照组明显增高($P<0.05$,图 6),而 TNF-α 的分泌水平较干扰序列对照组明显降低($P<0.05$,图 6)。

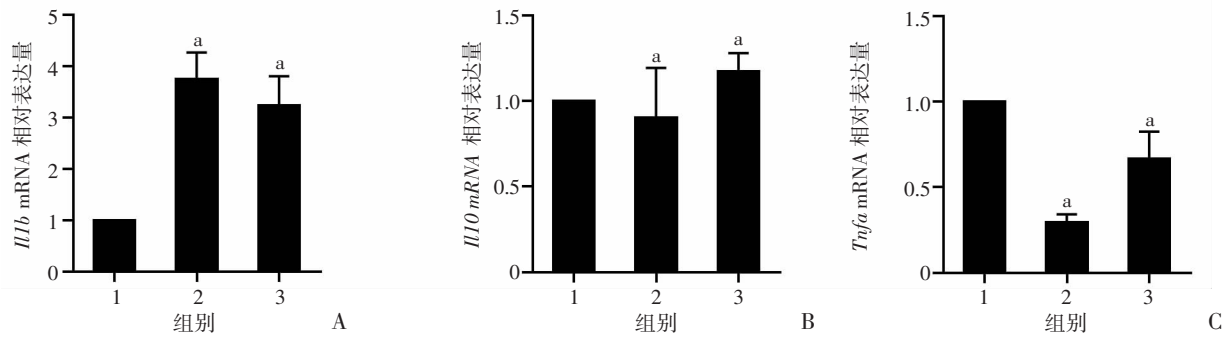
3 讨论

探讨缺氧诱导的巨噬细胞炎症反应及其调控机制,对缺氧相关疾病的防治具有重要意义。本研究中,我们采用 qRT-PCR 和 ELISA 检测了缺氧(1%O_2)对 RAW264.7 巨噬细胞中炎症相关细胞因子 IL-1β、



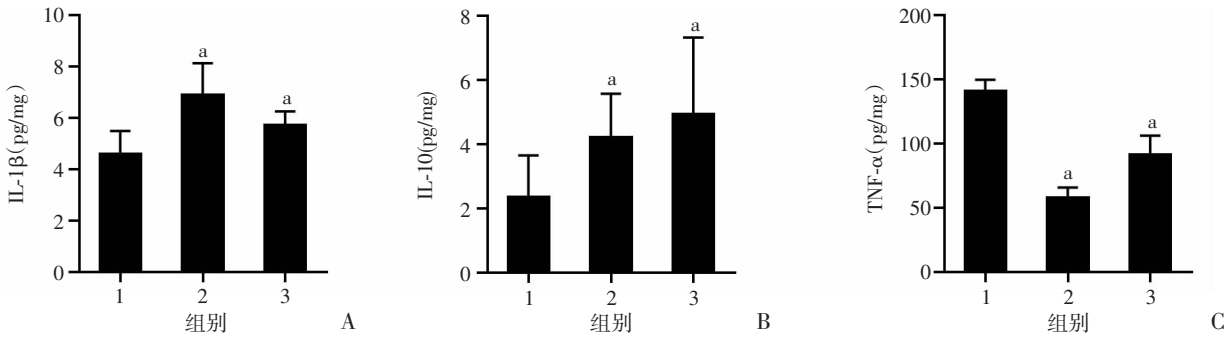
1:NC;2:si-*Dusp*1-001;3:si-*Dusp*1-002;4:si-*Dusp*1-003;A、B:Western blot 检测转染 si-*Dusp*1 后缺氧 RAW264.7 细胞 DUSP1 蛋白的表达水平;C:qRT-PCR 检测转染 si-*Dusp*1 后缺氧 RAW264.7 细胞 *Dusp*1 mRNA 的表达水平;a:$P<0.05$,与 NC 组比较

图 4 转染 si-*Dusp*1 下调缺氧 RAW264.7 细胞中 DUSP1 的表达 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



1:NC;2:si-*Dusp*1-001;3:si-*Dusp*1-003;A:*Il1b*;B:*Il*10;C:*Tnfa* mRNA;a:$P<0.05$,与 NC 组比较

图 5 转染 si-*Dusp*1 对缺氧 RAW264.7 细胞中 *Il1b*、*Il10* 和 *Tnfa* mRNA 表达的影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



1:NC;2:si-*Dusp*1-001;3:si-*Dusp*1-003;A:IL-1β;B:IL-10;C:TNF-α;a:$P<0.05$,与 NC 组比较

图 6 转染 si-*Dusp*1 对缺氧 RAW264.7 细胞 IL-1β、IL-10 和 TNF-α 分泌水平的影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

IL-10 和 TNF-α 表达和分泌的影响。缺氧能够诱导 RAW264.7 细胞中 *Il1b* 的 mRNA 表达显著上调,并且引起 IL-1β 分泌水平显著增加[10-11]。白瑜珊等[12]报道低氧可引起 RAW264.7 细胞中 *Il1b* 的 mRNA 表达上调,并且放大 LPS 诱导的 IL-1β mRNA 和蛋白表达。本研究结果与既往文献报道基本一致。LAHAT 等[13]报道在缺氧处理 24 h 的 RAW264.7 细胞中,尽管 *Tnfa* 的 mRNA 表达水平有上升趋势,但差异并无统计学意义。本研究结果也显示,缺氧对 RAW264.7 巨噬细胞中 TNF-α 的 mRNA 表达及分泌水平的影响不明显,仅在缺氧暴露 12 h 时观察到 *Tnfa* mRNA 表达下调。目前关于缺氧对巨噬细胞中 IL-10 表达和分泌影响的研究报道较少。WANG 等[14]报道缺氧可引起人外周血单个核细胞中 IL10 mRNA 表达水平降低,此外,缺氧还可抑制 LPS 诱导的 IL10 mRNA 表达。在本实验中,我们发现,在缺氧处理后的 RAW264.7 巨噬细胞中,*Il10* 的 mRNA 表达上调,IL-10 的分泌水平呈现增高趋势。KOSCSÓ 等[15]报道在 TLR 配体刺激活化的小鼠小胶质细胞中,外源性腺苷可通过激活 A_{2B} 腺苷受体(A2B adenosine receptors,A_{2B}AR)促进 *Il10* 的 mRNA 表达增加,*Il10* 基因启动子中的 CREB 结合区域介导了腺苷对 *Il10* 转录的增强作用。缺氧引起的微环境中腺苷增加可能是缺氧诱导 RAW264.7 巨噬细胞中 *Il10* mRNA 表达增加的原因之一。缺氧暴露后 RAW264.7 巨噬细胞中促炎细胞因子 *Il1b* mRNA 表达增加,与此同时抑炎细胞因子 *Il10* mRNA 表达也增加,这可能反映了缺氧应激情况下巨噬细胞炎症免疫反应的一种自身调控过程。

DUSP 家族是拓展的蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase,PTP)家族中的一员,因其既能够去磷酸化酪氨酸残基,又能够去磷酸化丝/苏氨酸残基而得名[16]。DUSP1 是 DUSP 家族中最早被鉴定也是其中最重要的成员。研究显示,多种外界刺激因子如紫外线、病原体蛋白等可以引起 DUSP1 表达上调[17]。本研究室前期对平原人急进 5 300 m 高原前后全血转录组学的研究结果显示,进入高原后 DUSP1 基因的转录水平较进入高原前升高[18]。在本研究中,我们观察到缺氧暴露 12、24 和 36 h 均能显著上调 RAW264.7 细胞中 DUSP1 mRNA 和蛋白表达。目前关于缺氧引起 DUSP1 表达增加的机制仍不完全清楚。KUČERA 等[19]报道缺氧以不依赖 HIF 的方式上调胚胎干细胞中 DUSP1 的表达。SETA 等[20]报道使用 p38 MAPK 通路抑制剂 SB203580 预处理抑制 p38 激酶活性,可显著降低缺氧诱导的 *Dusp*1 mRNA 表达,提示低氧诱导的 *Dusp*1 表达上调至少部分通过 p38 激酶介导。MISHRA 等[21]报道低氧暴露 60 min 后小鼠脑组织中 DUSP1 的蛋白表达水平增高,但是其活性降低,缺氧引起的 DUSP1 表达升高和活性降低可能是由 NO 介导。

近来的研究发现,DUSP1 在炎症及免疫应答中发挥重要的调节作用。在 TLR 配体刺激引起的巨噬细胞炎症免疫反应中发挥重要的负调控作用,在适应性免疫反应中,DUSP1 参与调节 T 细胞分化、发育和活化等细胞生命过程,并与多种自身免疫性疾病的发生发展有关[9]。本研究中,我们采用 RNA 干扰技术对 DUSP1 在缺氧诱导的巨噬细胞炎症反应中的作用进行了初步探讨。我们发现干扰 *Dusp*1 表达后发现,相较于 NC 组,缺氧 RAW264.7 细胞中 IL-1β 的 mRNA 表达和分泌水平明显增加,TNF-α 的 mRNA 表达和分泌水平明显降低,尽管 *Il10* 的 mRNA 表达无明显改变,但 IL-10 的分泌水平明显增加。既往研究提示 DUSP1 主要通过调节 P38 MAPK 通路调控 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应。TALWAR 等[22]报道在 LPS 刺激的 Dusp1$^{-/-}$ 小鼠骨髓来源的巨噬细胞中,活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生和 HIF-1α 表达增高,DUSP1 通过调节 p38 MAPK 的活性调节 ROS 产生和 HIF-1α 表达,进而介导 LPS 刺激引起的 IL-1β 的转录和蛋白表达增加。SMALLIE 等[23]报道 LPS 刺激的 *Dusp*1$^{-/-}$小鼠骨髓来源的巨噬细胞 TNF-α 和 IL-10 的 mRNA 和蛋白表达水平升高,DUSP1-p38 MAPK-MK2 调控模块通过调控 RNA 结合蛋白锌指蛋白 36(tristetraprolin,TTP)的表达和翻译后修饰影响 mRNA 的稳定性来调节细胞因子的表达。与 TLR 配体诱导的巨噬细胞炎症反应不同的是,干扰 *Dusp*1 表达后,缺氧 RAW264.7 细胞中 TNF-α 的表达和分泌均明显降低。在接受 LPS 刺激后,*Dusp*1 $^{-/-}$小鼠来源巨噬细胞中 *Tnfa* mRNA 的过度表达仅在接受 LPS 刺激后的早期出现,而 *Il10* 的 mRNA 表达水平则持续高于 LPS 刺激的野生型小鼠来源巨噬细胞;在 LPS 刺激后期 *Dusp*1 $^{-/-}$小鼠来源巨噬细胞中 *Tnfa* mRNA 表达低于野生型组的原因可能与增加的 IL-10 对 *Tnfa* 表达的抑制有关,因为在 LPS 刺激之前给予野生型和 *Dusp*1 $^{-/-}$小鼠来源巨噬细胞 IL-10 中和抗体能够明显增加 LPS 诱导的 TNF-α 的 mRNA 表达[24]。因此,干扰 *Dusp*1 表达后,缺氧 RAW264.7 细胞中 TNF-α 的 mRNA 表达和分泌水平明显降低可能与 IL-10 的增加有关。有关 DUSP1 调节缺氧诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中上述炎症相

关细胞因子表达的具体机制有待进一步研究。

综上所述,本研究发现,缺氧暴露下,RAW264.7细胞中DUSP1的表达增加,炎症相关细胞因子*Il1b*、*Il10*的mRNA表达增加,IL-1β的分泌水平增加;干扰*Dusp*1表达后缺氧处理的RAW264.7细胞中IL-1β表达和分泌明显增加,TNF-α的表达和分泌明显降低,IL-10的分泌水平明显增加,提示DUSP1通过调节IL-1β、IL-10和TNF-α的表达和(或)分泌参与调控缺氧诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症免疫反应。DUSP1是干预缺氧诱导的巨噬细胞炎症免疫反应的潜在靶点。

参考文献:

[1] RAHAT M A, BITTERMAN H, LAHAT N. Molecular mechanisms regulating macrophage response to hypoxia[J]. Front Immunol, 2011, 2: 45. DOI: 10.3389/fimmu.2011.00045

[2] CHEN T, YANG C, LI M, *et al*. Alveolar hypoxia-induced pulmonary inflammation: from local initiation to secondary promotion by activated systemic inflammation[J]. J Vasc Res, 2016, 53(5-6): 317-329. DOI: 10.1159/000452800

[3] 杨诚忠,李满满,罗羽莎,等. LIGHT在低氧性肺动脉高压形成中的作用及机制[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(8): 643-651. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201711151
YANG C Z, LI M M, LUO Y S, *et al*. Role of LIGHT in development of hypoxic pulmonary hypertension in mice[J]. J Third Mil Med Univ, 2018, 40(8): 643-651. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201711151

[4] VERGADI E, CHANG M S, LEE C, *et al*. Early macrophage recruitment and alternative activation are critical for the later development of hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. Circulation, 2011, 123(18): 1986-1995. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.978627

[5] WEISBERG S P, MCCANN D, DESAI M, *et al*. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue[J]. J Clin Invest, 2003, 112(12): 1796-1808. DOI: 10.1172/JCI19246

[6] CULLBERG K B, FOLDAGER C B, LIND M, *et al*. Inhibitory effects of resveratrol on hypoxia-induced inflammation in 3T3-L1 adipocytes and macrophages.[J]. J Funct Foods, 2014, 7: 171-179. DOI: 10.1016/j.jff.2014.02.015

[7] BOUTROS T, CHEVET E, METRAKOS P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer[J]. Pharmacol Rev, 2008, 60(3): 261-310. DOI: 10.1124/pr.107.00106

[8] KIM H S, ASMIS R. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) in macrophage biology and cardiovascular disease. A redox-regulated master controller of monocyte function and macrophage phenotype[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 109: 75-83. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.020

[9] LANG R, RAFFI F. Dual-specificity phosphatases in immunity and infection: An update[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(11): 1-26. DOI: 10.3390/ijms20112710

[10] WANG Y, CHEN J C, MA Y Y, *et al*. Upregulations of glucocorticoid-induced leucine zipper by hypoxia and glucocorticoid inhibit proinflammatory cytokines under hypoxic conditions in macrophages[J]. J Immunol, 2012, 188(1): 222-229. DOI: 10.4049/jimmunol.1002958

[11] HUANG G, SU J, ZHANG M, *et al*. RhoB regulates the function of macrophages in the hypoxia-induced inflammatory response[J]. Cell Mol Immunol, 2017, 14(3): 265-275. DOI: 10.1038/cmi.2015.78

[12] 白瑜珊,焦时宇,曲爱娟. 低氧增强巨噬细胞中脂多糖诱导的IL-1β表达[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(5): 610-615. DOI: CNKI:SUN:JCYL.0.2018-05-008
BAI Y S, JIAO S Y, QU A J. Hypoxia amplifies lipopolysaccharide-induced IL-1β expression in macrophages[J]. Basic Clin Med, 2018, 38(5): 610-615. DOI: CNKI:SUN:JCYL.0.2018-05-008

[13] LAHAT N, RAHAT M A, KINARTY A, *et al*. Hypoxia enhances lysosomal TNF-alpha degradation in mouse peritoneal macrophages[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 295(1): C2-C12. DOI: 10.1152/ajpcell.00572.2007

[14] WANG P L. The effect of hypoxia on the production of interleukin-10 (IL-10) in human mononuclear cells[D]. Leicester: University of Leicester. 2010.

[15] KOSCSÓ B, CSOKA B, SELMECZY Z, *et al*. Adenosine augments IL-10 production by microglial cells through an A2B adenosine receptor-mediated process[J]. J Immunol, 2012, 188(1): 445-453. DOI: 10.4049/jimmunol.1101224

[16] ALONSO A, PULIDO R. The extended human PTPome: a growing tyrosine phosphatase family[J]. FEBS J, 2016, 283(8): 1404-1429. DOI: 10.1111/febs.13600

[17] 彭华志. DUSP1在人正常及骨关节炎滑膜细胞中的表达及对骨关节炎的保护作用[D]. 西安: 第四军医大学, 2017.
PENG H Z. The expression of DUSP1 in human normal and osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes and its protective role in osteoarthritis[D]. Xi'an: Fourth Military Medical University, 2017.

[18] LIU B, CHEN J, ZHANG L, *et al*. IL-10 dysregulation in

acute mountain sickness revealed by transcriptome analysis [J]. Front Immunol, 2017, 8: 628. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00628

[19] KUĊERA J, NETUSILOVA J, SLADECEK S, *et al*. Hypoxia downregulates MAPK/ERK but not STAT3 signaling in ROS-dependent and HIF-1-independent manners in mouse embryonic stem cells[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 4386947. DOI: 10.1155/2017/4386947

[20] SETA K A, KIM R, KIM H W, *et al*. Hypoxia-induced regulation of MAPK phosphatase-1 as identified by subtractive suppression hybridization and cDNA microarray analysis [J]. J Biol Chem, 2001, 276(48): 44405-44412. DOI: 10.1074/jbc.M103346200

[21] MISHRA O P, DELIVORIA PAPADOPOULOS M. Effect of hypoxia on the expression and activity of mitogen-activated protein (MAP) kinase-phosphatase-1 (MKP-1) and MKP-3 in neuronal nuclei of newborn piglets: the role of nitric oxide [J]. Neuroscience, 2004, 129(3): 665-673. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.09.005

[22] TALWAR H, BAUERFELD C, BOUHAMDAN M, *et al*. MKP-1 negatively regulates LPS-mediated IL-1β production through p38 activation and HIF-1α expression[J]. Cell Signal, 2017, 34: 1-10. DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.02.018

[23] SMALLIE T, ROSS E A, AMMIT A J, *et al*. Dual-Specificity Phosphatase 1 and Tristetraprolin Cooperate To Regulate Macrophage Responses to Lipopolysaccharide[J]. J Immunol, 2015, 195(1): 277-288. DOI: 10.4049/jimmunol.1402830

[24] CHI H, BARRY S P, ROTH R J, *et al*. Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(7): 2274-2279.

(收稿:2019-09-20;修回:2019-11-27)

(编辑 黄 超)