doi:10.11659/jjssx.01E016087

IFIT1 在放射损伤与感染应激中表达的特点和意义

郭晓姝[1,2],郝玉徽[1],粟永萍[1],王军平[1],王 崧[1],许 杨[1] (1.第三军医大学全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038;2.长治医学院生理教研室,山西 长治 046000)

[摘 要] **目的** 探讨 IFIT1(Interferon-induced protein with tetratricopetide repeats 1)在放射损伤与感染应激中表达的特点和意义。**方法** 采用5 μg/mL 的脂多糖(LPS)刺激 Raw264.7、3T3 和 10T1/2 细胞株5 h 后,收集细胞,提取 RNA,行 RT-PCR 观察 IFIT1 的表达情况,同时设定空白对照组。另外,将20 只 C57/BL6 小鼠随机分为4 组,采用12 Gray60Co一次性全身照射,分别于0 h、1 h、4 h、和 12 h 脱颈处死取肝组织,用 western blot 测定肝组织 IFIT1 表达变化。**结果** Raw264.7、3T3 和 10T1/2 细胞株经 LPS 刺激5 h 后,均能诱导 IFIT1 表达,空白 对照组表达为阴性。C57/BL6 小鼠放射性损伤后,1 h IFIT1/Actin 开始增高,12 h 达最高,呈上升趋势,差异有极显著性统计学意义($P<0.01$)。**结论** LPS 可刺激多种细胞株表达 IFIT1,提示 IFIT1 可能参与创伤后毒血症的发生和发展;放射损伤早期能引起小鼠肝组织 IFIT1 的显著增高。

[关键词] 放射性损伤;脂多糖;IFIT1;糖皮质激素受体;毒血症

[中图分类号] R631.1;R146;R644 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-01-05

Characteristics and significance of interferon – induced protein with tetratricopetide repeats 1 expressed in radiation injury and infection stress

GUO Xiao-shu1,2, HAO Yu-hui1, SU Yong-ping1, WANG Jun-ping1, WANG Song1, XU Yang1 (1. Institute Combined Injury of Third Military Medical University; State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Chongqing 400038, China; 2. Department of Physiology, Changzhi Medical college, Changzhi Shanxi 046000, China)

Abstract: Objective To explore characteristics and significance of interferon-induced protein with tetratricopetide repeats 1 expressed in radiation injury and infection stress. **Methods** RNA was extracted from Raw264.7 cell, 3T3 cell and 10T1/2 cell after 5 hours stimulated with 5 μg/mL LPS. At the same time, to set up normal control group (untreated by LPS), and RNA of IFIT1 was detected by RT-PCR. Totally 20 C57/BL6 mice were randomly divided into 4 groups, namely 0 h group, 1 h group, 4 h group and 12 h group. The mice were given 12 Gray60Co full-body exposure once, then liver IFIT1 was detected by western blot. **Results** Stimulated with LPS for 5 hours, IFIT1 was induced expression in Raw264.7 cell, 3T3 cell and 10T1/2 cell. The expression of normal control group was negative. The level of IFIT1/Actin increased significantly 1 hour after radiation injury, and it reached the peak 12 hours after radiation injury ($P<0.01$). **Conclusion** LPS can stimulated a variety of cell lines expressed IFIT1, prompting that IFIT1 may participate in the occurrence and development of post-traumatic toxemia. IFIT1 of liver tissue increased significantly during the early stage in radiation mice.

Keywords: radiation injury; lipopolysaccharide; IFIT1; glucocorticoid receptors; toxemia

糖皮质激素(Glucocorticoid,GC)是应激发生中的关键激素,其功能的发挥决定于靶细胞上糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor,GR)的表达[1]。有研究采用酵母双杂交方法从人骨髓 cDNA 文库筛选到 IFIT1 与 GR 之间存在着相互作用[2]。应激源涉及广泛,包括物理性(电磁辐射、温度过高或过低)、生物性(微生物、毒素等)、机械性、化学性和心理/社会性损伤因素等[3]。在战时(核战争)和平时(核事故),核爆炸产生光辐射、冲击波、早期核辐射和放射性沾染4 种杀伤因素。射线-电离辐射作为引致“烧伤”的一种特殊原因(因为皮肤放射性损伤有很多方面与热能所致的烧伤相同),我们称之为放射性烧伤。其与热能烧伤既有相似也有差异之处。相似之处有深度划分、面积计算和主要临床表现;不同之处在于致伤因素、机制、临床经过、全身反应、愈合时程、癌变率及治疗措施均不同[4]。脂多糖(LPS)即内毒素,是革兰阴性杆菌细胞壁外表的类脂多糖复合物的简称。LPS 作为应激源能诱导多种细胞因子(TNF-α、IL-6 等)的释放,从而引起炎症反应,因此可以用 LPS 来直接刺激细胞株模拟体外毒血症的发生[5]。本试验使用放射性损伤和脂多糖(LPS)作为复制应激的模型,从蛋白和 RNA 两个水平上观察 IFIT1 的表达情况和变化趋势。通过对 IFIT1(Interferon-induced protein with tetratricopetide repeats 1)的初步研究,探讨其与 GR 功能的关系,旨在寻求减轻创伤应激的新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

兔抗鼠 IFIT1 多克隆抗体[6];羊抗兔 IgG-HRP(北

[基金项目] “十二五”国家科技支撑计划项目(2013BAK03B05-02);国家重点实验室开放课题(SKLKF201321);国家重点实验室自主研究课题(SKLZZ201503)

京中山);浓缩型 DAB 试剂盒(北京中杉);总蛋白裂解液(美国 Pierce);Actin(美国 Santa Cruz);Tripure 试剂盒(美国 Sigma);DEPC(美国 Sigma);One Step RNA PCR Kit(大连宝生物公司);EB(美国 Sigma);Raw264.7、3T3 和 10T1/2 细胞株(第三军医大学复合伤研究所提供),雄性 C57/BL6 小鼠 20 只(第三军医大学实验动物中心提供)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和动物模型制备 在 100 mL 玻璃培养瓶中,用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基培养 Raw264.7、3T3 细胞株和含 10% 小牛血清(FCS)的 DMEM 培养基培养 10T1/2 细胞株。在含 5% CO_2 的 37 ℃孵箱培养。取 3 种细胞株各 2 瓶(空白对照组和 LPS 刺激组),刺激组采用 5 μg/mL 的 LPS 刺激3 种细胞株 5 h 后终止刺激,收集细胞提取 RNA。将 20 只 C57/BL6 小鼠随机分为 4 组:致伤 0 h(对照组)、1 h、4 h、和 12 h 组,采用 12 Gray 60 Co 一次性全身照射,吸收剂量率约为 0.75 Gray/min,脱颈处死,取肝组织。

1.2.2 RT-PCR 法检测 IFIT1 RNA Tripute 试剂提取 RNA,经紫外分光光度计测定 RNA 含量。引物序列见表 1。按照 One Step RT-PCR 设计反应条件:RT 反应 50 ℃ 15 min,RTase 失活 94 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min,共 28 个循环。取 10 μl 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统扫描[7-8]。

表 1 β-actin(内参照)和 IFIT1 引物序列

引物		产物长度	
β-actin	上游	5′-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3′	241bp
	下游	5′-CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC-3′	
IFIT1	上游	5′-GCTACCACCTTTACAGCAACCAT-3′	580bp
	下游	5′-AATCTTGG CGATAGGCTACGACT- 3′	

1.2.3 Western blot 检测 IFIT1 蛋白的表达 总蛋白裂解液提肝组织总蛋白,Bradford 法测浓度,取 40 μg 行 10% SDS-PAGE 电泳,半干电转印 2 h,5% 脱脂奶粉 4 ℃封闭过夜,一抗兔抗鼠 IFIT1 多克隆抗体 1∶50,4 ℃过夜,二抗羊抗兔 IgG-HRP 1∶5 000,37 ℃孵育 2 h,0.01 mmol/L PBST 洗膜,DAB 显色,凝胶成像系统分析结果。

1.3 统计学分析

所有实验数据均以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SSPS 13.0 统计软件进行统计分析。采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 法(q 检验),$P<0.05$为差异具有统计学意义,$P<0.01$ 表示差异具有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 细胞实验结果

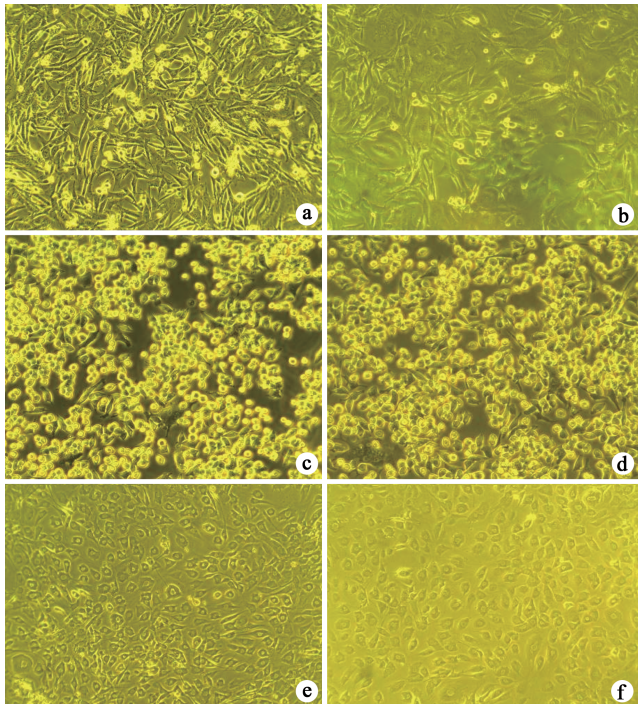
Raw264.7 为小鼠腹腔巨噬细胞、3T3 为小鼠源上皮型细胞、10T1/2 为小鼠源成纤维样细胞。LPS 刺激前,显微镜下见 3 种细胞株细胞均贴壁生长并呈群集现象;LPS 刺激 5 h 后,显微镜下见细胞开始分散生长,并有细胞开始变圆悬浮(图 1),培养基透明度降低。

2.2 RT-PCR 法检测 IFIT1

3 种细胞株 RT-PCR 均可见在 580 bp 处出现 IFIT1 阳性条带,正常对照无阳性条带出现,而内参照在 241 bp 处 2 组均有阳性条带出现(图 2),无细胞特异性。

2.3 Western blot 检测 IFIT1

IFIT1 分子量为 54kD,内参照 Actin 分子量为43 kD(图 3、4)。凝胶成像分析系统分析各条带 OD 值 × 面积(mm^2),即 INT。小鼠放射性损伤后早期 1 h 肝组织 IFIT1 表达开始显著增加,12 h 达高峰。IFIT1/Actin 统计结果(图 5),组间两两比较有显著差异($F=276.182$,$P<0.01$,检验 $\alpha=0.01$ 水平)。

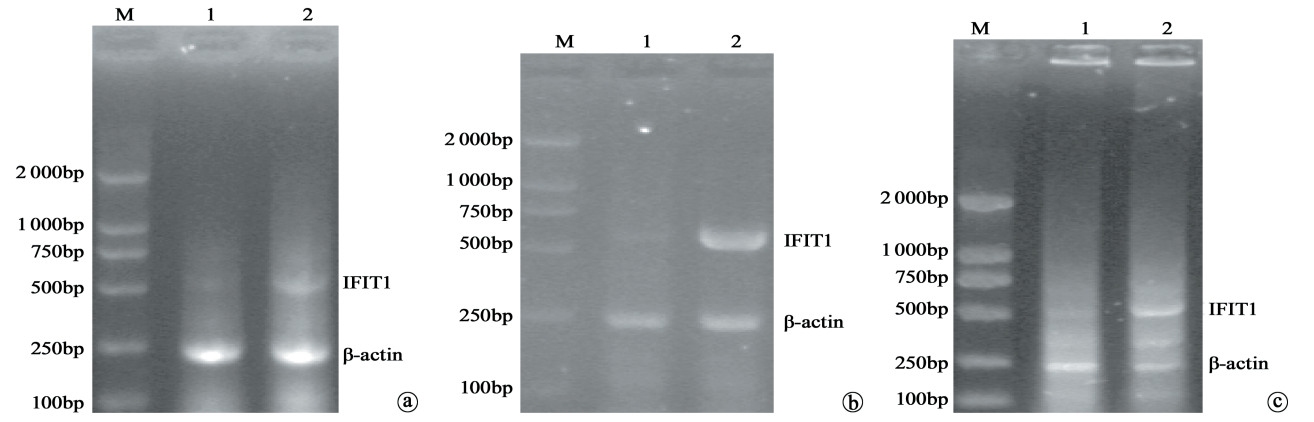


a:正常 10T1/2 细胞;b:LPS 刺激 5 h 后 10T1/2 细胞;c:正常 Raw264.7 细胞;d:LPS 刺激 5 h 后 Raw264.7 细胞;e:正常 3T3 细胞;f:LPS 刺激 5 h 后 3T3 细胞

图 1 LPS 刺激 5 h 后不同细胞光镜形态(×200)

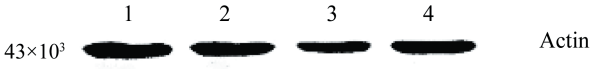
3 讨论

IFIT1 位于人类 10 号染色体,位于小鼠 19 号染色体,分子量为 56 kD[9]。大多数体外培养细胞该基因通常是沉默的,但病毒感染、双链 RNA、LPS 均可诱导 IFIT1 转录增强[10]。本研究通过一定浓度的 LPS 对多种小鼠源性细胞株进行刺激,均成功诱导产生了 IFIT1,且 IFIT1 表达无细胞特异性。而动物实验中,对照组小鼠有一定水平的IFIT1表达的原因,我们认为是



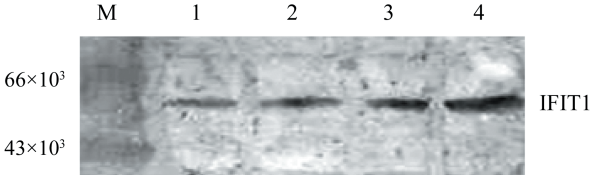
a:10T1/2 细胞;b:RAW264.7 细胞;c:3T3 细胞;M:标准;1:正常;2:LPS 刺激 5h

图 2 LPS 刺激 5h 后不同细胞 RT-PCR 表达情况



1~4:放射性损伤后 0 h、1 h、4 h 和 12 h

图 3 内参照 Actin



M:低分子量预染 marker;1~4:放射性损伤后 0 h、1 h、4 h 和 12 h

图 4 放射性损伤对肝细胞 IFIT1 表达的影响

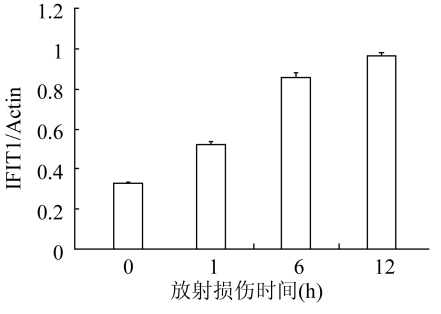


图 5 放射性损伤对小鼠肝组织 IFIT1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$, IFIT1/Actin)

由于在体情况下,肠道内存在有大量的革兰阴性杆菌(LPS 为其细胞壁主要成分),正常肠黏膜屏障仅允许少量 LPS 从肠腔被吸收入门静脉,从而诱导 IFIT1 有一定水平的表达。完整的肠黏膜和肝脏的单核吞噬细胞系统是阻止大量 LPS 进入体循环的有效屏障,动物实验同时表明,当小鼠在受到放射性损伤后,肠道黏膜屏障通透性增加的情况下,LPS 通过肝门脉大量进入血液和肝脏,可诱导 IFIT1 高表达,故 IFIT1 参与了毒血症的发生和发展[11]。

核爆炸导致的放射性性烧伤主要由 γ、β 和 X 射线引起。与热力烧伤迅速引起的凝固性坏死水泡、痂皮、焦痂不同,放射性烧伤常在局部组织形成溃疡,血管内皮和成纤维细胞再生能力严重受损,延缓愈合,但严重热能烧伤和放射性烧伤均可因烧伤局部变化引发全身反应[4]。我们把放射性损伤作为应激模型之一,希望通过其损伤后的应激反应来观察 IFIT1 的表达和变化趋势,以了解创伤早期应激损伤机理,有助于更好实施急救。

本研究表明,放射性损伤后早期 IFIT1 就呈显著升高趋势。我们认为一方面放射性损伤引起的体内应激反应通过肾上腺素受体途径导致干扰素激活转录因子复合体(ISGF3)转录增强,ISGF3 结合干扰素刺激反应元件(ISRE)导致 IFIT1 转录增强;另一方面感染(LPS)通过 Toll 样受体途径也会导致 ISGF3 转录增强,从而 IFIT1 转录增强;此外, LPS 通过激活机体单核巨噬细胞系统过度释放中间介质 TNFα、IL-1,通过细胞因子途径,以及干扰素增多通过结合 α/β 干扰素受体也会导致 ISGF3 转录增强,引起 IFIT1 转录增强[9,12],见图 5。有研究显示放射性损伤可以激活 MAPK(丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员)通路,主要表现为为细胞外信号调节激酶 EPK1/2、应激活化激酶 JNK 和 P38 的表达和调控[10],然而 IFIT1 的具体信号转导通路有待进一步研究。在前期实验中我们也发现严重烧伤后急性应激期 IFIT1 随着时间的延长也呈逐渐增高趋势[2,7],所以我们认为 IFIT1 是创伤应激后 GR 功能的重要阻遏因素。

综上所述,机体应激时 GC 急剧增高,此时 GR 表达和功能却降低的原因是:IFIT1 作为 GR 的阻遏子,增多的 IFIT1 与 GR 结合,导致其转录活性降低,与 GC 结合的功能减弱,从而导致 GC 的抗炎能力减弱,故 GC 对 HPA 轴的负反馈作用减弱[2]。严重创伤早期血清中参与全身炎症反应的细胞因子 TNF-α、IL-1、IL-6 的浓度显著升高[13-14],而高 IFIT1 表达与应激、感染和高细胞因子血症构成正反馈效应,随即引起机体全身性失控性炎症反应综合征(Systemic inflammatory response,SIRS)发生[15-17],见图 6。

另外,我们在前期实验中发现IFIT1在正常小鼠

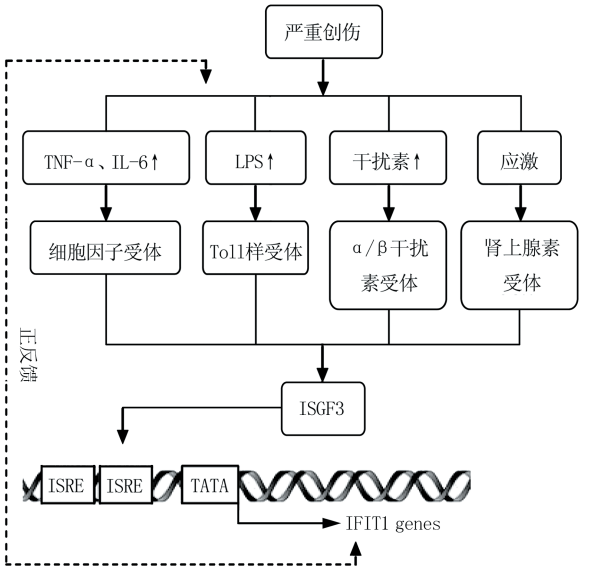


图 5 诱导 IFIT1 产生路径

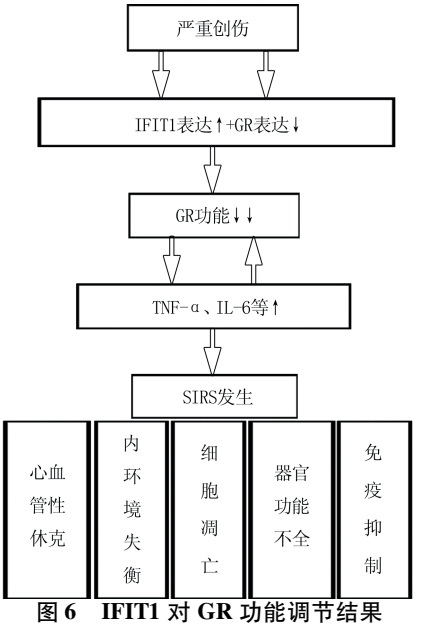


图 6 IFIT1 对 GR 功能调节结果

各器官组织呈普遍性表达,无组织特异性,但和应激明确相关的脏器如心、肝、小肠和肾表达明显高于其他脏器[2,7]。我们选取了肝作为 IFIT1 蛋白水平表达的器官,一方面是因为肝和应激密切相关;另一方面肝蛋白表达丰富,结果更易观测。

严重创伤重在急救[18]。如果能够在全身反应调控和 SIRS 的防治方面找到治疗方法,将有效提高救治效果。前期实验结合本实验我们可以看到 IFIT1 诱导生成的细胞外因素是多样性的,结合受体途径也是多种方式,细胞内具体信号转导通路是否也存在多样性是接下来要研究的内容。但本文作者认为,如果阻断信号转导通路可以作为一种中断 IFIT1 对 GR 的负性调控手段的话,倘若在应激早期及早进行中和性抗体(例如抗 IFIT1 抗体)治疗,同样可以防止炎性细胞因子长时间刺激和 GR 功能减退而诱发的 GC 抵抗及 SIRS 的发生。

[参考文献]

[1] 刘 东. ROCK1 介导的糖皮质激素调节炎症细胞功能的非基因组机制研究[D]. 重庆:第三军医大学,2012:2-14.

[2] 郭晓姝,小鼠干扰素诱导蛋白 IFIT1 多克隆抗体的制备及应用[D]. 重庆:重庆医科大学,2007:18-30.

[3] 温翠菊,热应激蛋白 70 与小剂量电离辐射、工频电磁场暴露人群应激适应关联研究[D]. 广州:南方医科大学,2010:2-10.

[4] 陈意生,史景泉,程天民,等. 现代烧伤病理学[M]. 北京:化学工业出版社,2008,258.

[5] 任 炯,粟永萍,李洪涛,等. JAB1 表达下调对 LPS 诱导炎性因子 TNF-α 和 IL-6 的影响[J]. 第三军医大学学报,2007,29(16):1552-1554. doi:10.16016/j.1000-5404.2007.16.002.

[6] 郭晓姝,李洪涛,方海立,等. 小鼠 IFIT1 多克隆抗体的制备[J]. 第三军医大学学报,2007,29(15):1462-1464. doi:10.3321/j.issn:1000-5404.2007.15.003.

[7] 郭晓姝,方海立,李 军,等. 颈交感神经阻滞对烧伤早期小鼠肝脏干扰素诱导蛋白 IFIT1 表达的影响[J]. 第三军医大学学报,2007,29(17):1647-1649. doi:10.3321/j.issn:1000-5404.2007.17.002.

[8] 巩继平,陈玉培,郭晓姝,等. 颈交感阻滞对烧伤早期小鼠各器官 IFIT1 表达的影响[J]. 第四军医大学学报,2009,30(6):485-488.

[9] Volker Fensterl,Ganes C Sen. The ISG56/IFIT1 Gene Family[J]. J Interferon Cytokine Res,2011,31(1),71-78. doi:10.1089/jir.2010.0101.

[10] 郭晓姝,巩继平,王 崧,等. 严重烧伤小鼠肝细胞 IFIT1 表达与凋亡的关系[J]. 中南大学学报(医学版),2015,40(6):598-604. doi:10.11817/j.1672-7347.2015.06.005.

[11] 帅 军. 对比经典型及劳力型热射病大鼠模型枯否细胞吞噬功能变化的研究[D]. 广州:南方医科大学,2014:2-6.

[12] Li HT,Su YP,Cheng TM,et al. The interaction between interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats-1 and eukaryotic elongation factor-1A. Mol Cell Biochem[J]. 2010,337(1-2):101-110. doi:10.1007/s11010-009-0289-9.

[13] 陈 茜. 异丙酚抗炎作用的分子机制研究:AnnexinA1 与 p38MAPK[D]. 广州:南方医科大学,2012:2-3.

[14] 郭晓姝,巩继平,王 崧,等. 颈交感神经神经阻滞对烧伤鼠脑应激因素表达的影响[J]. 中国急救医学,2013,33(7):650-653. doi:10.3969/j.issn.1002-1949.2013.7.017.

[15] 郭晓姝,张翠英,尚改萍,等. 颈交感神经阻滞对烧伤后大鼠下丘脑神经元放电形式及凋亡的影响[J]. 中国现代医学杂志,2012,22(32):17-21.

[16] 郭晓姝,巩继平,尚改萍,等. 颈交感神经阻滞对烧伤大鼠蓝斑放电的影响[J]. 重庆医学,2013,42(14):1598-1600. doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.14.013.

[17] 巩继平,陈玉培,郭晓姝,等. 氯胺酮对烧伤早期小鼠肝应激相关蛋白 IFIT1 和 JAB1 表达的影响[J]. 重庆医科大学学报,2008,33(11):1287-1290. doi:10.13406/j.cnki.cyxb.2008.11.037.

[18] 王军平,粟永萍. 交感神经调节在严重创伤救治中的作用与展望[J]. 第三军医大学学报,2009,31(1):10-12. doi:10.16016/j.1000-5404.2009.01.029.

(编辑:左艳芳)