基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000985

LPS通过 p38/MAPK 通路和 NF-κB 的活化诱导 RAW264.7 细胞 HIF-1α 的表达

符智慧，徐　凌，黄　姣，尹东青

（口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室、重庆医科大学附属口腔医院修复科、
重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室，重庆　400015）

【摘　要】目的：研究脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）在低氧条件下对 RAW264.7 细胞低氧诱导因子-1α（hypoxia-inducible factor 1α，HIF-1α）表达的影响及其可能的调控机制，探讨对牙周炎破骨细胞吸收的影响。**方法**：观察低氧条件下，用 1 μg/mL LPS 刺激 RAW264.7 细胞，应用 Western blot 以及 qRT-PCR 检测 HIF-1α 的表达和 P38/丝裂素活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinases，MAPK）和核转录因子-κB（nuclear transcription factor-κB，NF-κB）信号通路活化情况。干扰 HIF-1α 后在低氧中用 LPS 诱导 RAW264.7 细胞，ELISA 检测炎症因子 TNF-α、PGE2、IL-1β 以及 qRT-PCR 检测破骨细胞分化标志基因肿瘤坏死因子受体相关因子 6（tumor necrosis factor receptor associated factor 6，Traf6）、活化 T 细胞核因子 c1（nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic1，Nfatc1）、组织蛋白酶 K（cathepsin K，Ctsk）、cFos、抗酒石酸酸性磷酸酶（tartrate-resistant acid phosphatase，Trap）的变化。**结果**：低氧条件下 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 3、6、9、12 h 分别与 1 h 比较，HIF-1α 表达量明显增加（P=0.000、P=0.000、P=0.000、P=0.000）。在低氧条件下，LPS 刺激 RAW264.7 细胞 HIF-1α mRNA 的相对表达量水平（0.81 ± 0.14）高于单纯的低氧组（0.21 ± 0.05），2 组比较存在统计学差异（P=0.000）。低氧条件下 LPS 上调了 p38 的磷酸化水平（P=0.009），抑制 p38 以及 NF-κB 的表达明显抑制 HIF-1α 的表达（P=0.011、P=0.039）。干扰 HIF-1α 的表达明显抑制了低氧条件下 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 PGE2（94.46 ± 8.89）和 IL-1β（83.96 ± 7.71）的生成，分别与 siRNA-Control 组的 PGE2（134.66 ± 21.11）和 IL-1β（121.34 ± 20.42）比较，2 组比较存在统计学差异（P=0.008、P=0.008）；同时也抑制了低氧条件下 LPS 诱导的破骨细胞标志基因 Traf6、Nfatc1 的 mRNA 相对表达量（0.50 ± 0.20，0.60 ± 0.30）的表达，分别与 siRNA-Control 组（1.00 ± 0.00、1.00 ± 0.00）比较（P=0.000、P=0.000）。**结论**：LPS 在低氧条件下通过 p38/MAPK 通路和 NF-κB 的活化诱导了 RAW264.7 细胞 HIF-1α 表达，干扰 HIF-1α 的表达能够抑制低氧条件下 LPS 诱导的炎症因子的生成以及破骨细胞的分化。

【关键词】脂多糖；低氧；低氧诱导因子-1α；RAW264.7 细胞

【中图分类号】R783　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2015-12-08

LPS induced HIF-1α expression of RAW264.7 cells under hypoxia by simultaneously activating p38/MAPK and NF-κB signal pathway

Fu Zhihui，Xu Ling，Huang Jiao，Yin Dongqing

（*Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences*；
Department of Prosthodontics，the Affiliated Stomatological Hospital，Chongqing Medical University；
Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engeineering of Higher Education）

【Abstract】*Objective*：To investigate the effect of lipopolysaccharide（LPS）on hypoxia-induced factor-1α（HIF-1α）expression in RAW264.7 cells under hypoxia condition and to discuss its effect on bone resorption of periodontitis associated osteoclast. ***Methods***：RAW264.7 cells were treated with demanded concentration of LPS（1 μg/mL）under hypoxia condition. The expression of HIF-1α protein level was detected by Western blot and mRNA level was detected by qRT-PCR. Meanwhile，related signal molecules of p38/MAPK and NF-κB signaling pathways were determined. The changes of inflammatory cytokines（such as TNFα，PGE2，IL-1β）genereated by LPS-induced Raw264.7 cells and the expression of osteoclast-specific markers（such as Traf6，Nfatc1，Ctsk，cFos，Trap）were measured by ELISA and fluorescence qRT-PCR after small inteferring RNA knocking-down HIF-1α

作者介绍：符智慧，女，Email：hellofuzhihui@sina.com，研究方向：口腔修复学。

通信作者：尹东青，Email：cqmuydq@163.com。

基金项目：重庆市教委资助项目（编号：KJ1400234）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1658.116.html（2016-05-13）

expression. ***Results***: Under hypoxia condition, HIF-1α expression in cells induced by LPS for 3 h, 6 h, 9 h, 12 h increased significantly compared with cells treated with LPS for 1 h (P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000). Under hopoxia condition, HIF-1α mRNA expressions in cells induced by LPS(0.81 ± 0.14) were higher than those of pure hypoxia group(0.21 ± 0.05), with significant differences between the two groups(P=0.000). Under hypoxia condition, LPS caused up-regulation of the phosphorylation of p38/MAPK(P=0.009), and reversely suppressed the expression of HIF-1α by different specific inhibitors of p38/MAPK and NF-κB (P=0.011, P=0.039). After siRNA knocking down HIF-1α, LPS caused significant suppression in the level of PGE2(94.46 ± 8.89) and IL-1β(83.96 ± 7.71); there were significant differences in PGE2(134.66 ± 21.11) and IL-1β(121.34 ± 20.42) compared with those of siRNA-control group(P=0.008, P=0.008). Simutaneously, mRNA expressions of Traf6(0.50 ± 0.20) and Nfatc1(0.60 ± 0.30) were suppressed in siRNA-HIF-1α group compared with expressions of Traf6(1.00 ± 0.00) and Nfatc1(1.00 ± 0.00) in siRNA-control group(P=0.000, P=0.000). ***Conclusion***: LPS can induce HIF-1α expression of RAW264.7 cells under hypoxia possibly by simultaneously activating the p38/MAPK and NF-κB signal pathway. The application of siRNA targeting HIF-1a could effectively suppress the expression of inflammatory cytokines and the osteoclast-differentiation of RAW264.7 cells induced with LPS under hypoxia condition.

【Key words】*lipopolysaccharide*; *hypoxia*; *hypoxia-induced factor-1α*; *RAW264.7 cells*

牙周炎是常见的口腔慢性感染性疾病，以牙龈炎症、牙周袋形成、牙槽骨吸收为主要特征，最终可导致牙齿松动、脱落，其发病机制复杂，与细菌、宿主、环境密切相关[1]。牙龈卟啉单胞菌(porphyromonas gingivalis, Pg)是牙周病主要的致病菌之一，该菌及其代谢产物，特别是 LPS 通过激发免疫细胞和局部邻近组织细胞产生大量炎性因子，诱发宿主产生免疫炎症反应最终导致牙周组织的破坏和牙槽骨吸收紊乱[2-3]。在炎性肠病、癌症和感染中发现低氧可以诱导炎症反应，同时炎症又加剧组织或器官低氧[4]。研究显示细菌感染、吸烟、创伤等使牙周袋和局部牙周组织处于相对缺血、低氧状态，牙周炎症本身通过增加氧耗等途径降低牙周组织的局部氧张力[5-6]。同时在动物实验中证实低氧增加牙周组织氧化应激和炎症反应，加剧了牙周组织的损伤[7]。因此，低氧与牙周炎关系密切，低氧参与牙周炎的发生和发展，同时牙周炎中存在低氧。低氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor 1α, HIF-1α)是介导细胞低氧反应的核转录因子，也是哺乳动物对氧张力改变(低氧)产生适应性反应的重要要调节因子，其水平对氧张力的改变极其敏感[8]。此外，HIF-1α 还可以激活天然免疫反应，能够在缺氧和炎症条件发挥整合作用。研究发现，低氧与 HIF-1α 参与骨代谢的调节，Shao 等[9]研究发现 HIF-1α 通过上调骨保护素在骨重塑中扰乱成骨细胞和破骨细胞偶联。高文魁等[10]发现低氧可激活破骨细胞上游信号，增强破骨细胞活性。目前，HIF-1α 在牙周炎的炎症反应和牙槽骨骨吸收中作用及其调节机制还不清楚，本实验拟通过低氧条件下用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导破骨细胞前体细胞株 RAW264.7 细胞建立体外炎症模型，研究 HIF-1α 的表达变化及其可能机制，以期探讨 HIF-1α 信号分子在低氧条件下 LPS 介导的炎性骨吸收过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 购自于中科院细胞库；LPS(Invivogen, 美国)；MAPK/P38 通路抑制剂 SB203580 购自美国 Sigma 公司；NF-κB 通路抑制剂—毗咯烷二硫氨基甲酸(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)、抗体 HIF-1α(1:1 000)购自于 Abcam 公司；DMEM 培养基、α-MEM 培养基、胎牛血清购自 GIBCO 公司；M-CSF, RANKL 购自美国 PEPROTECH 公司；抗体 p-p38(1:1 000)、抗体 p38(1:1 000)和 β-actin(1:2 500)购自美国 Santa Cruz 公司；SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(碧云天公司)；Trizol 试剂、lipofactamine2000 (invitrogen 公司)；HIF-1α siRNA 片段以及同源对照均由(上海纽恩生物科技公司)合成；逆转录试剂盒(日本 Takara 公司)、qRT-PCR 试剂盒(美国 GeneCopoeia 公司)；小鼠 TNF-α、PGE2、IL-1β ELISA 试剂盒购自深圳达科为生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RAW264.7 细胞细胞复苏用含 10%胎牛血清，10^5 U/L 青霉素，100 mg/L 链霉素的 DMEM 在 37 ℃、5%CO_2 的饱和湿度培养箱中培养、隔天更换 1 次培养基，3~4 d 传代 1 次，取对数生长期细胞进行实验。破骨细胞用含 30 ng/mL M-CSF 及 100 ng/mL RANKL，10%胎牛血清，10^5 U/L 青霉素，100 mg/L 链霉素的 α-MEM，在 37 ℃、5%CO_2 的饱和湿度孵箱中诱导培养。

1.2.2 Western blot 检测 样本经 SDS 裂解液裂解，并收集蛋白样品，BCA 法测定蛋白浓度，按 20 μg 每泳道上样。遵试剂盒说明书进行电泳、转膜操作。封闭液封闭 1 h，加入特异性一抗 4 ℃孵育过夜；0.5%PBST 漂洗后，加入相应二抗 37 ℃孵育 1 h，漂洗后 ECL 显色检测蛋白条带。Western blot 用于 2 组实验：(1)在低氧状态下($2\%O_2$)处理 RAW264.7 细胞 12 h，用终浓度 1 μg/mL LPS 刺激细胞后，分别在 1、3、6、9、12 h 检测HIF-1α 的表达情况。(2)检测低氧条件下 LPS 作用于 RAW264.7 细胞 12 h 后，活化 p38/MAPK 信号的情况，以及用 p38 通路的抑制剂 SB203580(1 μg/mL)预处理 1 h 后，更换含有 1 μg/mL LPS 培养 12 h，检测 p38 和 HIF-1α 的表达情况。使用 Fusion 软件进行定量分析，对照组标化为“1”。实验重复 3 次。

1.2.3 iRNA 干扰 根据 GenBank 数据库提供的小鼠的：(GenBank NM_001313919.1)的靶序列，运用 Gene specific siRNA selector 软件进行设计，获得以 HIF-1α 编码区为靶点的特异性 siRNA 寡核苷酸序列。转染前将细胞以 2×10^4 个/孔接种于 12 孔细胞培养板。待细胞密度适合转染后按照 lipofectamine2000 的说明书将 siRNA-control 以及 siRNA-HIF-1α 片段转染于细胞中，再进行后续实验。采用的 siRNA 片段如下：si-HIF-1α（正义链）：5'-GATCCGAGTTCACCTG-AGCCTAATATTCAAGAGATATTAGGCTCAGGTGAACTCTTT TTTTCTAGAG-3'；(反义链)：3'-GCTCAAGTGGACTCGG-ATTATAAGTTCTCTATAATCCGAGTCCACTTGAGAAAAAAA AGATCTCTTAA-5'；同时选取一对与人 HIF-1α 基因序列完全没有同源性的 siRNA 寡核苷酸序列作为阴性对照，均由上海纽恩生物科技公司合成。

1.2.4 总 RNA 提取和荧光定量 PCR 检测 荧光定量 PCR 检测 2 组实验：(1)在低氧条件下，用终浓度 1 μg/mL LPS 刺激 RAW264.7 细胞 12 h 以及用 NF-κB 抑制剂 PDTC(10 μmol/mL)预处理 1 h 后，更换含有 1 μg/mL LPS 培养 12 h 后检测 HIF-1α 的表达情况。(2)分别转染 siRNA-control 及 siRNA-HIF-1α 48 h 后，低氧条件下 LPS 作用于 RAW264.7细胞 12 h，更换破骨细胞诱导培养基培养 5 d，检测破骨细胞分化标志 Traf6、Nfatc1、Ctsk、cFos、Trap mRNA 的表达。

总 RNA 提取：处理后 264.7 细胞及破骨细胞培养至预定时间。弃掉孔内多余培养基，用 PBS 冲洗 2 次，每个孔内加入 1 mL 的 Trizol 裂解液置于冰箱，30 min 后轻轻摇晃培养瓶使细胞全部脱落，再 4 ℃静置 30 min 后，吸出移入 1.5 mL 的 EP 管内；在 EP 管内加入 0.2 mL 氯仿充分混匀，室温静置 20 min；4 ℃高速离心机中，12 000 g/min 离心 15 min 取出，吸出上清液，后加入异丙醇清洗，后 12 000g/min 离心 10 min，弃去掉上清液；加入 1 mL 75%乙醇(由无酶水配置)；7 500 g/min 离心 5 min；自然干燥后将 RNA 沉淀溶解于适量 DEPC 或无酶水中，置于-20 ℃备用。取 2 μL 逆转录产物进行 PCR 反应：10 μL 2×All-in-OneTM qPCRMix，2 μL 上、下游引物(0.2 μmol/L)，2 μL cDNA，加水至总体积为 20 μL。反应条件：95 ℃，10 min；40 个 PCR 循环：95 ℃10 s；60 ℃ 0 s；72 ℃ 20 s。使用的引物见表 1。

表 1 引物基因序列

Tab.1 Primer sequences

引物名称	引物序列
HIF-1α	上游引物 5c-GGTATTATTCAGCACGACT-3'
	下游引物 5c-GGAGACATTGCCAGGTTTA-3'
Traf6	上游引物 5c-AAGATTGGCAACTTGGGATG-3'
	下游引物 5c-GTGGGATTGTGGGTCGCGCT-3'
Nfatc1	上游引物 5c-CTGCAACGGGAAACGGAAGAGAAG-3'
	下游引物 5c-TATACACCCCCAGACCGCATCAGC-3'
Ctsk	上游引物 5c-TGACTTCCGCAATCCTTAC-3'
	下游引物 5c-GCAGCAGAAACTTGAACAC-3'
cFos	上游引物 5c-CCAAGCGGAGACAGATCAACTT-3'
	下游引物 5c-TCCAGTTTTTCCTTCTCTTTCAGCAGA-3'
Trap	上游引物 5c-CGAGGGAATAAAGGCTCAGG-3'
	下游引物 5c-CGAACTCAGCAAAGGTGAGC-3'
β-actin	上游引物 5c-GATCTGTACCGCAGGCACTC-3'
	下游引物 5c-ATGTACGCACGATTTCC-3'

1.2.5 ELISA 法对 TNFα，PGE2 和 IL-1β 的检测 接种及转染细胞操作同前，siRNA-control 以及 siRNA-HIF-1α 转染 48 h 后，弃去原培养液，PBS 轻轻洗涤细胞 1 次后，更换新的培养基，加入 1 μg/mL LPS 在低氧下刺激 12 h 后终止培养，集上层培养基，离心后上清转入 tube 管中备用，将备好的培养基加入已平衡至室温板条的相应孔中(100 μL/孔)。置于 37 ℃孵箱反应 120 min，用洗涤液取出板充分洗涤 4~6 次，滤纸拍干。每孔加入一抗工作液 50 μL，充分混匀，37 ℃反应 60 min，再洗板 4~6 次，干后每孔加入酶标抗体工作液 100 μL，37 ℃孵箱反应 60 min，洗板 5 次，加入底物工作液 100 μL/孔，37 ℃孵箱暗处反应 5~10 min，每孔加入终止液 1 滴，混匀。酶联检测仪即刻测量 492 nm 吸光度(absorbance，A)值，减去空白孔 A 值，绘制标准曲线图，计算出样品中 TNF-α、PGE2 和 IL-1β 的含量。

1.3 统计学处理

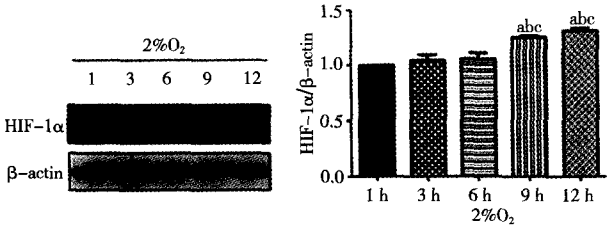
采用 SPSS 21.0 软件进行统计处理，各组数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，两组比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，组内两两比较方差齐采用 LSD-t 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 LPS 能够促进 RAW264.7 细胞 HIF-1α 的表达

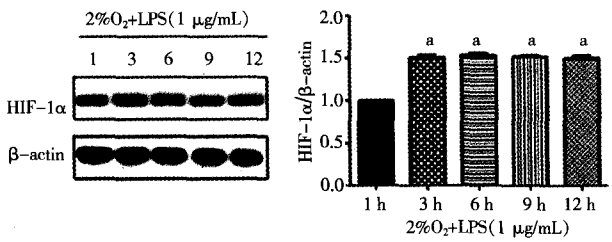
在低氧状态下($2\%O_2$)，Western blot 检测发现低氧条件可诱导 HIF-1α 蛋白水平的增加，HIF-1α 相对表达量在 1、3、6、9、12 h 分别为(1.00±0.00)、(1.05±0.09)、(1.06±0.09)、(1.25±0.03)、(1.32±0.04)，5 组差异具有统计学意义(F=14.582，P=0.000)。与 1、3、6 h 比较，9、12 h 2 组的 HIF-1α 相对表达量增加(P=0.001、P=0.003、P=0.004)(P=0.000、P=0.000、P=0.001)，其余各组间比较差异无统计学意义(图1A)。同时在低氧条件下再加入 1 μg/mL 的 LPS 刺激，细胞的HIF-1α 的蛋白水平自 3 h 后明显增加，且直到 12 h 都维持较高水平，HIF-1α 相对表达量在 1、3、6、9、12 h 分别为(1.00±0.00)、(1.51±0.06)、(1.53±0.05)、(1.51±0.03)、(1.50±0.05)，5

组差异具有统计学意义(F=84.202,P=0.000)。低氧(2%O_2)加LPS诱导3、6、9、12 h分别与1 h比较,HIF-1α相对表达量明显增加(P=0.000、P=0.000、P=0.000、P=0.000)(图1B)。提示LPS增强低氧条件下HIF-1α的表达(图1A、B)。此外,对HIF-1α的mRNA水平也进行了检测(图1C),qRT-PCR结果发现,在常氧、常氧加LPS、低氧、低氧加LPS 4种条件下培养RAW264.7细胞12 h后,HIF-1α的mRNA相对表达量存在统计学差异(F=98.037,P=0.000)。在单纯的低氧状态下HIF-1α的mRNA相对表达量(0.21 ± 0.05)水平低于单纯的常氧组(1.00 ± 0.15),2组比较存在统计学差异(P=0.000);LPS加常氧条件下HIF-1α mRNA相对表达量(1.81 ± 0.08)水平高于单纯的常氧组(1.00 ± 0.15),2组比较存在统计学差异(P=0.000);同样在低氧条件下,LPS刺激RAW264.7细胞HIF-1αmRNA的相对表达量水平(0.81 ± 0.14)高于单纯的低氧组(0.21 ± 0.05),2组比较存在统计学差异(P=0.000)。



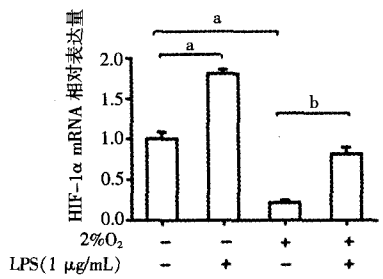
a:低氧(2%O_2)9 h、12 h vs. 低氧(2%O_2)1 h比较;b:低氧(2%O_2)9 h、12 h vs. 低氧(2%O_2)3 h;c:低氧(2%O_2)9 h、12 h vs. 低氧(2%O_2)6 h;

A. Western blot检测2%O_2低氧诱导不同时间后HIF-1α蛋白水平的表达



a:低氧(2%O_2)+LPS诱导3、6、9、12 h vs. 1 h

B. Western blot检测低氧(2%O_2)+LPS诱导不同时间后HIF-1α蛋白水平的表达



a:常氧+LPS组,低氧(2%O_2)组 vs. 常氧组;b:低氧(2%O_2)+LPS组 vs. 低氧组;n=3,$\bar{x} \pm s$

C. qRT-PCR检测HIF-1α mRNA的表达

图1 LPS对Raw264.7细胞HIF-1α蛋白和mRNA表达的影响

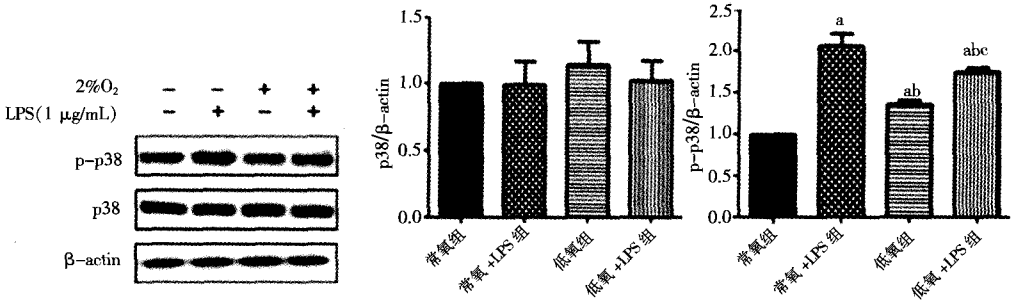
Fig.1 Effect of LPS on HIF-1α protein and mRNA expression in raw264.7 cells

2.2 低氧条件下LPS诱导的HIF-1α表达通过p38/MAPK通路且促进了NF-κB的活化

为了确定低氧条件下LPS诱导的HIF-1α所涉及的通路,检测了分组处理12 h后p38蛋白水平以及磷酸化的变化,如图2A所示,在常氧、常氧加LPS、低氧、低氧加LPS 4种条件下培养RAW264.7细胞12 h后,尽管p38总蛋白在LPS作用12 h并没有明显的改变,但p38磷酸化水平在LPS处理后却有明显的增加。p38总蛋白相对表达量分别为(1.00 ± 0.00)、(0.99 ± 0.29)、(1.15 ± 0.29)、(1.03 ± 0.26),4组差异无统计学意义(F=0.250,P=0.859)。磷酸化p38相对表达量分别为(1.00 ± 0.00)、(2.06 ± 0.25)、(1.36 ± 0.10)、(1.75 ± 0.80),4组差异有统计学意义(F=32.334,P=0.000)。常氧加LPS组、低氧组、低氧加LPS组分别与常氧组比较磷酸化p38相对表达量增加(P=0.000、P=0.014、P=0.000);低氧组、低氧加LPS组分别与常氧加LPS组比较磷酸化p38相对表达量减少(P=0.000、P=0.026);低氧加LPS组与低氧组比较磷酸化p38相对表达量增加(P=0.009)(图2A)。随后,用p38通路的抑制剂SB203580(1 μg/mL),观察其对低氧条件下LPS诱导RAW264.7细胞的HIF-1α蛋白水平表达的影响(图2B),低氧、低氧加LPS、低氧加抑制剂、低氧加抑制剂加LPS处理后磷酸化p38和HIF-1α相对表达量分别为(1.00 ± 0.00、2.39 ± 0.22、0.72 ± 0.06、1.09 ± 0.18)和(1.00 ± 0.00、2.13 ± 0.23、1.66 ± 0.50、0.91 ± 0.11),4组差异具有统计学意义(F=79.811,P=0.000)和(F=12.726,P=0.002)。与低氧组比较,低氧加LPS组的磷酸化p38和HIF-1α相对表达量增加(P=0.000、P=0.001);低氧加抑制剂组磷酸化p38减少(P=0.046)和HIF-1α相对表达量增加(P=0.021);低氧加抑制剂加LPS组的磷酸化p38和HIF-1α相对表达量无统计学差异(P=0.449、P=0.704)。与低氧加LPS组比较,低氧加抑制剂的磷酸化p38相对表达量明显减少(P=0.000),HIF-1α相对表达量无统计学差异(P=0.449,P=0.072);低氧加抑制剂加LPS组的磷酸化p38和HIF-1α相对表达量明显减少(P=0.000,P=0.001)。与低氧加抑制剂组比较,低氧加抑制剂加LPS组的磷酸化p38增加(P=0.013)和HIF-1α相对表达量明显减少(P=0.011)。Western blot的结果显示p38的抑制剂能够明显抑制低氧条件下LPS诱导的HIF-1α的表达。在低氧条件下加入NF-κB抑制剂PDTC(10 μmol/mL)处理12 h,观察其对低氧条件下LPS诱导RAW264.7细胞的HIF-1α mRNA水平表达的影响(图2C),荧光定量PCR结果发现,低氧、低氧加NF-κB抑制剂、低氧加LPS、低氧加NF-κB抑制剂加LPS处理后HIF-1α mRNA相对表达量分别为(1.00 ± 0.26)、(1.23 ± 0.60)、(2.05 ± 0.20)、(1.23 ± 0.45),4组的差异具有统计学意义(F=3.786,P=0.050)。与低氧组比较,低氧加LPS组的HIF-1α mRNA相对表达量明显增加(P=0.014);与低氧加NF-κB抑制剂加LPS组比较,低氧加LPS组的HIF-1α mRNA相对表达量明显减少(P=0.039)。说明NF-κB抑制剂能够明显抑制低氧条件下LPS诱导的HIF-1α的表达。

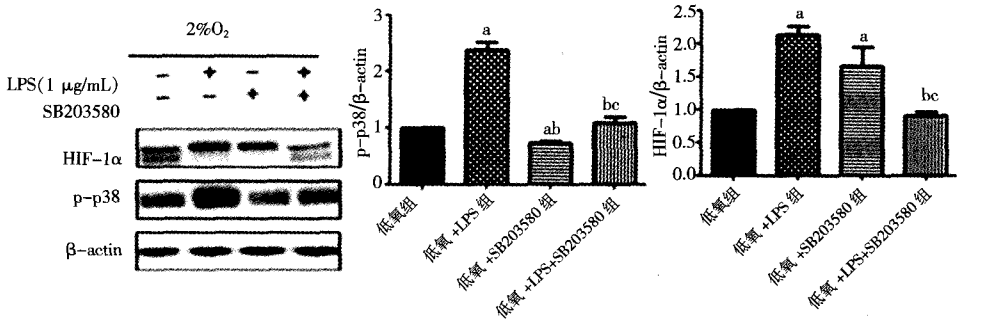
2.3 干扰HIF-1α抑制了低氧条件下LPS诱导的RAW264.7细胞PGE2和IL-1β的生成

为了更加明确HIF-1α在低氧条件下LPS的刺激下RAW264.7细胞活化的过程中所扮演的角色,通过siRNA干



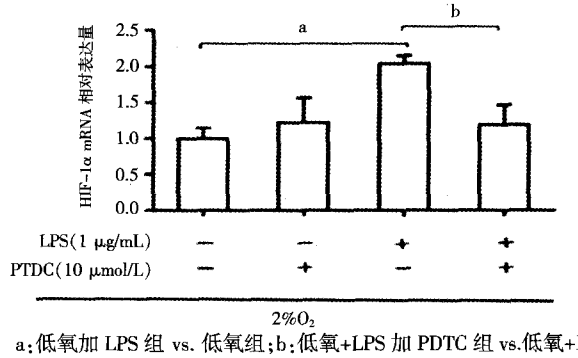
a：常氧+LPS 组，低氧（2%O_2）组，低氧（2%O_2）+LPS 组分别 vs. 常氧组；b：低氧（2%O_2）组，低氧（2%O_2）+LPS 组 vs. 常氧+LPS 组；c：低氧（2%O_2）+LPS 组 vs. 低氧（2%O_2）组

A. Western blot 检测 p38、p-p38 的蛋白水平



a：低氧+LPS 组，低氧+SB203580 组，低氧+LPS+SB203580 组 vs. 低氧组；b：低氧+SB203580 组，低氧+LPS+SB203580 组 vs. 低氧+LPS 组；c：低氧+LPS+SB203580 组 vs.低氧+SB203580 组

B. Western blot 检测不同处理后 p-p38、HIF-1α 的蛋白水平



a：低氧加 LPS 组 vs. 低氧组；b：低氧+LPS 加 PDTC 组 vs.低氧+LPS 组，$\bar{x} \pm s$

C. 荧光定量 PCR 检测 HIF-1αmRNA 的表达

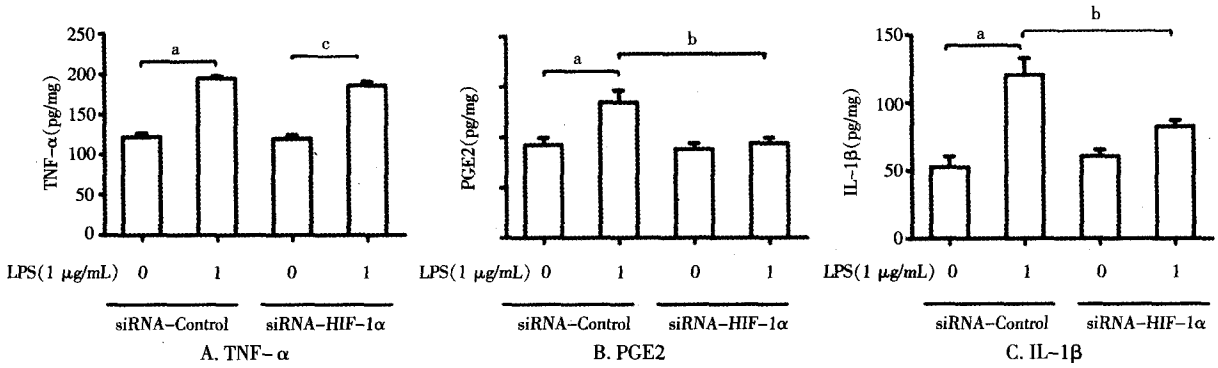
图 2　LPS 对 p38/MAPK 通路和 NF-κB 信号活化的影响

Fig.2　Effect of LPS on p38/MAPK and NF-κB signaling pathways

扰了 HIF-1α 基因，并观察抑制 HIF-1α 表达后，在低氧下 LPS 诱导 RAW264.7 细胞对炎症因子的释放比如 TNFα，PGE2 和 IL-1β 的影响。ELISA 的结果显示（图 3），在低氧条件下，siRNA-Control 组、siRNA-Control 加 LPS 组、siRNA-HIF-1α 组和 siRNA-HIF-1α 加 LPS 组处理 12 h 后 TNF-α、PGE2、IL-1β 的分泌量分别为（121.98 ± 7.94、92.39 ± 12.36、52.94 ± 13.47），（194.81 ± 6.22、134.66 ± 21.11、121.34 ± 20.42），（120.05 ± 7.26、88.38 ± 10.21、60.91 ± 8.65）和（186.40 ± 7.07、94.46 ± 8.89、82.96 ± 7.71），TNFα、PGE2、IL-1β 的分泌量差异均有统计学意义（F =95.438、P=0.000）、（F =7.166、P=0.012）、（F =15.363、P=0.001）。siRNA-Control 加 LPS 组的 TNF-α、PGE2、IL-1β 均明显高于 siRNA-Control 组（P=0.000、P=0.006、P=0.000）；此外，在转染了 HIF-1α-siRNA 的细胞中，siRNA-HIF-1α 组中 TNFα 明显高于 siRNA-HIF-1α 加 LPS 组（P=0.000），PGE2 和 IL-1β 两组比较无统计学意义（P=0.609，P=0.081）；siRNA-HIF-1α 加 LPS 组的 PGE2 和 IL-1β 的分泌量明显低于 siRNA-Control 加 LPS 组，2 组比较存在统计学差异（P=0.008、P=0.008）（图 3B、C）。

2.4　干扰 HIF-1α 抑制了低氧条件下 LPS 诱导的破骨细胞标志物基因的表达

此外，检测了干扰 HIF-1α 基因后对低氧条件下 LPS 诱导的破骨细胞分化的影响。转染后在低氧条件下加入 LPS 继续刺激 RAW264.7 细胞 12 h；用 qRT-PCR 对破骨细胞标志物基因 Traf6、Nfatc1、Ctsk、cFos、Trap 的 mRNA 的表达进行了检测（图 4），结果发现 siRNA-HIF-1α 组的 Traf6、Nfatc1 的 mRNA 相对表达量（0.50 ± 0.20、0.60 ± 0.30）较 siRNA-Control 组（1.00 ± 0.00、1.00 ± 0.00）明显下降，差异具有统计学意义（t=43.301、P=0.000）和（t=23.094，P=0.000）。

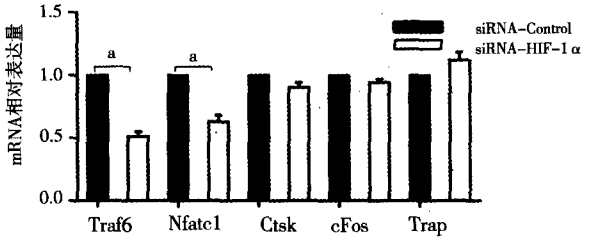


a:低氧下 siRNA-Control 加 LPS 组 vs. siRNA-Control 组；b:低氧下 LPS 加 siRNA-HIF-1α 组 vs. LPS 加 siRNA-Control 组；c:低氧下 LPS 加 siRNA-HIF-1α 组 vs. siRNA-HIF-1α 组，$n=3$，$\bar{x} \pm s$

ELISA检测在低氧中敲低 HIF-1α 条件下 LPS 诱导的 TNF-α、PGE2、IL-1β 的含量

图 3 干扰 HIF-1α 基因对 LPS 诱导的炎症因子的影响

Fig.3 Effect of siRNA knockdown of HIF-1α on the expression of inflammatory cytokines induced by LPS



qRT-PCR检测在低氧中敲低 HIF-1α 条件下 LPS 诱导的破骨细胞分化标志 Traf6、Nfatc1、Ctsk、cFos、Trap 的表达；a:低氧中 LPS刺激细胞 siRNA-HIF-1α 组 vs. siRNA-Control 组，$n=3$，$\bar{x} \pm s$

图 4 干扰 HIF-1α 基因对 LPS 作用下破骨细胞分化标志的影响

Fig.4 Effect of siRNA knockdown of HIF-1α on the expression of osteoclast-specific markers induced by LPS

3 讨 论

作为异二聚体的低氧诱导转录因子 HIF-1，其控制转录的基因产物广泛参与包括调节红细胞生成、能量代谢、细胞生存、凋亡、细胞粘附和运动以及血管发生等多种生理活动。HIF-1 由 α 亚基和 β 亚基组成。其中，HIF-1α 仅与细胞氧张力有关，而 HIF-1β 在细胞中组成性表达；α 亚基是 HIF-1α 的调节和活性亚基。HIF-1α 蛋白在常氧状态下极不稳定，但能在缺氧条件下保持稳定，所以是组织缺氧的内在标志。炎症时组织中存在低氧现象已经在一系列炎症性疾病得到证实，比如慢性牙周炎[11]。贺小宁等[12]试验证实，牙周炎牙龈组织中 HIF-1α 的表达是明显增强的，提示 HIF-1α 在牙周炎发病过程中可能具有潜在的的调控作用。而在对牙龈炎、牙周炎的组织标本进行免疫组化的最新研究中显示，炎症同时增加了 NF-κB 和 HIF-1α 的表达[13-14]。在牙周炎中，LPS 的毒力因子通过 Toll 样受体激活免疫统释放炎症因子激发炎症反应，而深牙周袋加重了局部组织缺氧，故牙周炎可以被认为是 LPS 和低氧同时存在下引起的紊乱[15]。除此之外，炎症诱导的缺氧微环境，咀嚼研磨的机械应力以及正畸处理都有可能通过变形压缩的小血管导致氧含量的降低。实际上，厌氧菌、牙合创伤、吸烟等均能使牙周袋和牙周组织处于相对缺血和低氧状态；而炎症本身也会降低牙周组织局部氧张力使组织呈现低氧状态[16]。牙周炎就是牙周组织在这种低氧和局部炎症因子侵润的微环境下加重的宿主反应从而导致组织瓦解和破坏的。

破骨细胞是重要的牙周靶细胞，本身起源于骨髓单核-巨噬细胞，且在骨吸收与骨形成的动态平衡中重具有重要的意义：当破坏骨细胞的骨吸收功能超过成骨细胞骨形成的作用后，骨丧失形成[17]。因而，破骨细胞在牙周病的治疗中备受关注。在低氧条件下观察 LPS 对破骨前体细胞的 HIF-1α 的表达变化，以期探讨 HIF-1α 信号分子在体外模拟的牙周炎性模型中所涉及的潜在机制。根据本次的研究结果，单纯的低氧条件下培养破骨前体细胞，HIF-1α 的表达就会升高，这与 Anand 的研究结果[18]一致，HIF-1α 参与低氧状况下的生理反应从而影响机体或细胞的反应。在低氧环境下经 1 μg/mL 的 LPS 刺激，破骨前体细胞 HIF-1α 的表达增加更为明显，这说明 LPS 在缺氧条件下增强了低氧诱导的 HIF-1α 的聚集；HIF-1α 不仅是活跃的低氧效应分子，同时也是敏感的炎症效应分子。在对 HIF-1α mRNA 的检测中发现，虽然缺氧下 HIF-1α mRNA 的表达增加并不明显，但在正常或缺氧的状态下 LPS 反而显著刺激了 HIF-1α mRNA 的表达。实际上，HIF-1α 在有氧细胞中表达甚低，有时甚至检测不到，只有在

特定的刺激或微环境的改变下，HIF-1α 水平才会迅速升高并与 HIF-1β 结合形成一个完整的 HIF-1 转录复合体并参与相应靶基因的转录调控。不管怎样，本次得到的第一个线索就是：缺氧下存在着 HIF-1α 的活化，而 LPS 的刺激增强了 HIF-1α 的表达。也有研究已经证实[19]，在常氧条件下一些细胞，比如肿瘤细胞、上皮细胞、以及血管内皮细胞中，炎症介质就能够诱导 HIF-1α；而在这些情况下，缺氧联合存在的炎症介质会更加明显的增强这种活化的效应。

细菌 LPS 为革兰氏阴性的细胞壁成分，是众所周知的引发炎症反应的毒力因子。细胞对 LPS 反应的重要组成部分是可溶性或膜结合 CD14、TLR4（Toll 样受体）[20]。在缺氧联合 LPS 的复杂作用下会导致 TLR4 下游各种各样的磷酸化级联反应的激活。在本次实验的细胞中，缺氧联合 LPS 的处理下 p38 磷酸化显著增加，其次是增加的 HIF-1α 基因表达和蛋白聚集。p38 的活化似乎是低氧下 LPS 诱导的 HIF-1α 激活的关键，因为当应用抑制剂SB203580 阻断 p38 信号的时候，降低了低氧下 LPS 诱导的HIF-1α 的激活。此外，有报道 HIF-1α 的启动子上有NF-κB 的结合位点，那么 NF-κB 作为 TLR4 的重要下游，是否也参与其中；HIF-1α 的表达变化是否也经过了经典的 NF-κB 活化？为了验证该假设，本课题组同时也应用了 NF-κB 的抑制剂，观察抑制 NF-κB后 HIF-1α 的表达变化，结果与该假设一致，这样的处理也会明显降低低氧下 LPS 诱导的 HIF-1α 的表达。

破骨细胞作为 LPS 重要的靶细胞也一直是牙周病治疗关注的重点。一方面，LPS 促进破骨细胞的分化促进骨吸收[21]。另一方面，LPS 则通过促进COX-2 的表达，增加前列腺素 E2（PGE2）的分泌；产生的 PEG2 又通过自分泌和旁分泌的形式作用于成骨细胞，影响着成骨细胞的合成与分泌。而这一过程中，HIF-1α 所扮演的具体角色还不甚清楚。为了更为清晰的探讨这一过程，课题组干扰了 HIF-1α 基因的表达，并观察在低氧环境和 LPS 的刺激下对破骨细胞炎症因子的分泌以及破骨细胞分化的标志基因的影响，结果显示，干扰 HIF-1α 会抑制了 LPS 诱导的 IL1 和 PGE2 的表达，也抑制了破骨细胞分化标志基因 Traf6、Nfatc1 的表达。这对本课题组今后开展关于 HIF 在破骨细胞中的研究奠定了关键的一步，也将为深入研究牙周病骨吸收的机制提供新的靶点。

参 考 文 献

[1] Chapple IL. Time to take periodontitis seriously[J]. BMJ,2014(348):g2645.

[2] Nishi K,Oda T,Takabuchi S,et al. LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner[J]. Antioxidants &Redox Signaling,2008,10(5):983-995.

[3] Peyssonnaux C,Datta V,Cramer T,et al. HIF-1α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes[J]. Journal of Clinical Investigation,2005,115(7):1806-1815.

[4] Eltzschig HK,Carmeliet P. Hypoxia and Inflammation[J]. N Engl J Med,2011,364(7):656 - 665.

[5] 王 斌,王小琴. 慢性间歇低氧对大鼠牙周炎模型血清及牙龈组织中白细胞介素-18 和低氧诱导因子-1α 的影响[J]. 华西口腔医学杂志,2015,33(4):383-387.

[6] Huang S,Lu F,Zhang Z,et al. The role of psychologic stress-induced hypoxia-inducible factor-1α in rat experimental periodontitis[J]. J Periodontol,2011,82(6):934-941.

[7] 武 曦,黄镜静,张 纲,等. 高原低氧环境对兔牙周炎模型血清和牙龈组织中超氧化物歧化酶活力的影响[J]. 华西口腔医学杂志,2012,30(3):247-250.

[8] Schönenberger MJ,Kovacs WJ. Hypoxia signaling pathways:modulators of oxygen-related organelles[J]. Front Cell Dev Biol,2015(3):42.

[9] Shao J,Zhang Y,Yang T,et al. HIF-1α disturbs osteoblasts and osteoclasts coupling in bone remodeling by up-regulating OPG expression[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim,2015,51(8):808-814.

[10] 高文魁,王 伟,王德元,等. 低氧对破骨细胞活性的影响及其机制[J]. 西北国防医学杂志,2011,32(6):409-412.

[11] 施庆颜,靳 华,蓝 田,等. 缺氧诱导因子 1α 在人慢性牙周炎牙龈组织中的表达[J]. 中国病理生理杂志,2013,29(9):1668-1671.

[12] 贺小宁,陈文军,李 斌. 牙龈组织 HIF-1 表达水平与牙周炎相关性的研究[J]. 宁夏医学杂志,2007,29(10):883-884.

[13] Gölz L,Memmert S,Rath-Deschner B,et al. Hypoxia and P.gingivalis synergistically induce HIF-1 and NF-κB activation in PDL cells and periodontal diseases[J]. Mediators Inflamm,2015(2015):438085.

[14] Ng KT,Li JP,Ng KM,et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1α in human periodontal tissue[J]. J Periodontol,2011,82(1):136-141.

[15] 简从相. 低氧对脂多糖诱导的牙周膜细胞炎症因子及 OPG/RANK 表达的作用研究[D]. 重庆：第三军医大学，2014.

[16] 李 松,宋忠臣,束 蓉. 低氧及低氧诱导因子-1 与牙周炎[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志,2013,23(11):729.

[17] 陈晓虎,孙瑜隆,赛爱荣,等. 破骨细胞的形成和活化研究进展[J]. 中国细胞生物学学报,2014,36(2):258 - 266.

[18] Anand RJ,Gribar SC,Li J,et al. Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1alpha-dependent manner[J]. J Leukoc Biol,2007 ,82(5):1257-1265.

[19] 王 亮. LPS 和 TNF-α 诱导小鼠腹腔巨噬细胞 HIF-1α 表达的信号通路研究[D]. 苏州：苏州大学，2009.

[20] Płóciennikowska A,Hromada-Judycka A,Borzecka K,et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. Cell Mol Life Sci,2015,72(3):557-581.

[21] 王胜利. 脂多糖对体外诱导培养的小鼠破骨细胞分化和活性的影响[D]. 河南：河南大学，2014.

（责任编辑：冉明会）