

脂多糖(LPS)对小鼠 Raw 264.7 细胞 Irak1bp1 表达的影响

谈志丽[▲] 王迎迎[▲] 何玉钟 欢 施青青 杨雪 徐国荣 刘亮明[△]

(上海市松江区中心医院感染科 上海 201600)

【摘要】 目的 研究脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)刺激小鼠 Raw 264.7 细胞 IL-1 受体相关激酶 1 结合蛋白 1 (IL-1 receptor associated kinase 1 binding protein 1,Irak1bp1)的表达情况。**方法** 体外培养的小鼠 Raw 264.7 细胞随机分为 2 组:A 组为正常对照组,B 组为 LPS 刺激组。LPS 刺激小鼠 Raw 264.7 细胞 6 h 后收集细胞及上清液。采用实时荧光定量 PCR 法检测 IL-6 及 Irak1bp1 mRNA 水平;采用 ELISA 分析培养上清液中 IL-6 含量;采用 Western blot 方法检测 Irak1bp1 蛋白质水平。**结果** LPS 刺激组炎症因子 IL-6 mRNA 及蛋白质水平较对照组明显增高($P<0.01$),Irak1bp1 mRNA 及总蛋白质水平高于对照组($P<0.05$);胞质内 Irak1bp1 蛋白质水平与对照组相比无明显变化,而胞核内 Irak1bp1 蛋白质水平较正常对照组增加($P<0.01$)。**结论** LPS 能够诱导 Raw 264.7 细胞核内 Irak1bp1 表达,且该分子的表达上调可能与细胞的炎性因子释放相关。

【关键词】 Raw 264.7 细胞; 脂多糖(LPS); IL-1 受体相关激酶 1 结合蛋白 1(Irak1bp1); IL-6; 小鼠

【中图分类号】 Q51 **【文献标识码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2019.04.010

Effects of lipopolysaccharide (LPS) on the expression of Irak1bp1 in mouse Raw 264.7 cells

TAN Zhi-li[▲], WANG Ying-ying[▲], HE Yu, ZHONG Huan, SHI Qing-qing,
YANG Xue, XU Guo-rong, LIU Liang-ming[△]

(Department of Infection Diseases, Shanghai Songjiang Central Hospital, Shanghai 201600, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of IL-1 receptor associated kinase 1 binding protein 1 (Irak1bp1) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated mouse Raw 264.7 cells. **Methods** Cultured mouse Raw 264.7 cells were divided randomly into two groups:normal control (A) group and LPS stimulation (B) group. Cells and supernatants were collected after mouse Raw 264.7 cells treated with LPS for 6 h. The expressions of IL-6 and Irak1bp1 mRNA were detected by real-time PCR. The secretion of IL-6 in cell supernatants was analyzed by ELISA. The expression of Irak1bp1 protein was detected by Western blot. **Results** The expression and secretion of IL-6 mRNA and protein were significantly higher than the control group ($P<0.01$). The expression of Irak1bp1 mRNA and total Irak1bp1 protein was significantly higher than the control group ($P<0.05$). The expression of Irak1bp1 protein in cytoplasm was not significantly changed compared with normal, while in cell nucleus it significantly increased ($P<0.01$). **Conclusions** LPS stimulation can induce the expression of nuclear Irak1bp1 protein, which may be associated with inflammatory releases in Raw 264.7 cells.

【Key words】 Raw 264.7 cell; lipopolysaccharide (LPS); IL-1 receptor associated kinase 1 binding protein 1 (Irak1bp1); IL-6; mouse

国家自然科学基金(81770612,81070357,30660066);上海市松江区科技攻关项目(16SJGG57);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX17_1306)

[▲]TAN Zhi-li and WANG Ying-ying contributed equally to this work

[△]Corresponding author E-mail:liuliangming@hotmail.com

* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81770612, 81070357, 30660066), Science and Technology Research Project of Songjiang District, Shanghai (16SJGG57) and Postgraduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province, China (KYCX17_1306).

巨噬细胞是体内重要的免疫细胞之一,在机体免疫炎症反应中发挥重要的作用,其表面的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)如 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)可被外来病原体或内毒素激活,启动炎症信号通路,促进促炎细胞因子的表达与分泌[如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6 和 IL-1 β 等],产生损伤性炎症反应^[1]。IL-1 受体相关激酶 1 结合蛋白 1 (IL-1 receptor associated kinase 1 binding protein 1, Irak1bp1)的编码基因位于 6q14.1, 全长 79 356 bp^[2], 是 Irak1 蛋白质的结合蛋白。Irak1 蛋白质在 TLR4 介导的 MyD88 依赖的信号通路中,被接头蛋白 MyD88 磷酸化后激活 TNF 受体相关因子 6(TNF receptor associated factor 6, TRAF6)并使之泛素化,泛素化的 TRAF6 分子招募转化生长因子- β 活化激酶 1(TGF- β activated kinase-1, TAK1), TAK1 能够磷酸化激活 I κ B 蛋白激酶(I κ B kinase, IKK),进而促进 NF- κ B 释放入核,激活 NF- κ B 炎症通路^[3]。目前研究表明 Irak1bp1 蛋白质与炎症关系密切,但是对于炎症反应的具体调控作用及调控机制仍存在不同的观点^[4-5], Conner 等^[6] 研究发现 Irak1bp1 能够抑制 IL-6 分泌而促进 IL-10 分泌,发挥抑炎作用;而 Benson 等^[7] 却发现 Irak1bp1 能够促进 IL-6 及 IL-8 分泌。为进一步了解 Irak1bp1 蛋白质与炎症反应的关系,本研究采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激小鼠 Raw 264.7 细胞,研究核内外 Irak1bp1 蛋白质的表达情况。

材 料 和 方 法

主要试剂和材料 单核细胞系 Raw 264.7 细胞购自中国科学院上海细胞库;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;LPS 购自美国 Sigma 公司;Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;PCR 相关试剂购自日本 Takara 公司;ELISA 相关试剂购自美国 Ebioscience 公司;Western blot 相关试剂购自上海碧云天生物技术有限公司;Irak1bp1 兔多克隆抗体购自美国 Abcam 公司; β -actin 及 Lamin B1 兔单克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司。

细胞培养 采用 RPMI 1640 细胞培养基(含 90% RPMI 1640 培养液、10% FBS 和 100 U/mL 青链霉素混合液),于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养小鼠 Raw 264.7 细胞。采用锥虫蓝染色检测细胞活力。

细胞分组和处理 细胞接种于 6 孔板,每孔细胞数为 5×10^5 个。培养 24 h 待其稳定贴壁后,将细胞随机分成 2 组:A 组为正常对照组,B 组为 LPS 刺激组。LPS 以 RPMI 1640 培养液配置,终浓度为 20 μ g/mL,剂量及用法见参考文献^[8],于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。LPS 刺激 6 h 后分别收集细胞和上清液用于后续实验,实验重复 6 次。

总 RNA 的提取和质量检测 采用 Trizol 试剂提取总 RNA,具体操作按照说明书进行。采用吸光度比值($D_{260/280}$)及琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 纯度及完整性:纯度良好(1.8~2.0)、RNA 条带完整(28S 和 18S 条带明亮清晰,28S 的亮度是 18S 的 2 倍以上)者进行下一步实验。

逆转录和实时荧光定量 PCR 取 1 μ g RNA 作为模板用于第一链 cDNA 的合成,具体流程按照逆转录试剂盒说明书进行。引物的设计与合成由上海生工生物技术有限公司完成,目的基因和内参引物序列见表 1。实时荧光定量 PCR 反应体系(20 μ L): 2 \times SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) 10 μ L、上游引物(10 μ mol/L) 0.4 μ L、下游引物(10 μ mol/L) 0.4 μ L、50 \times ROX 参比染料 II 0.4 μ L、DNA 模板 2 μ L、dH₂O(灭菌蒸馏水) 6.8 μ L。采用两步法进行扩增,第 1 步:95 °C、30 s,1 个循环;第 2 步:95 °C、5 s,60 °C、34 s,40 个循环。GAPDH 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法对数据进行相对定量分析。

表 1 基因扩增引物序列和产物长度

Tab 1 Primer sequences and product length of gene amplification

Gene	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
Irak1bp1	F: AACTCAGGTGGGCTGATGAC	109
	R: AGGGGTTTCAGGTCTGCATT	
IL-6	F: CGGAGAGGAGACTTCACAGAG	104
	R: ATTTCCACGATTTCCCAGAG	
GAPDH	F: TGGCCTTCCGTGTTCTCTAC	178
	R: GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA	

ELISA 检测 采用双抗体夹心酶联免疫技术检测细胞上清液中 IL-6 的水平,按照试剂盒说明书进行操作。每份标本设 2 个复孔,取均值。实验重复 6 次。

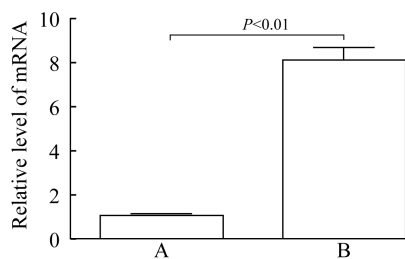
Western blot 检测 按照 Western blot 及 IP 裂解液说明书进行总蛋白提取,浆蛋白及核蛋白提取按照碧云天核蛋白和浆蛋白抽提试剂盒说明书进行。采用 BCA 法检测蛋白质浓度,变性、分装后于 -70°C 冻存。取 $30\ \mu\text{g}$ 总蛋白、浆蛋白及核蛋白进行 10 % SDS-PAGE,电泳后将蛋白质转移至 NC 膜,室温牛奶封闭 2 h,兔抗鼠一抗(1:1 000 稀释) 4°C 过夜, TBST 漂洗,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗,室温反应 1 h。漂洗后置于显色液中显色,通过伯乐分子成像系统成像并观察,采用 image J 软件进行灰度值分析。

统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件处理相关数据。所有实验重复 6 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

LPS 促进 Raw 264.7 细胞 IL-6 mRNA 表达

A、B 组 Raw 264.7 细胞 IL-6 mRNA 相对水平分别为 $1.00 \pm 0.06 (n=6)$ 和 $8.13 \pm 0.50 (n=6)$, B 组较 A 组显著升高 ($P < 0.01$, 图 1), 提示 LPS 促进 Raw 264.7 细胞 IL-6 mRNA 的表达。



A: Control group; B: LPS stimulation group.

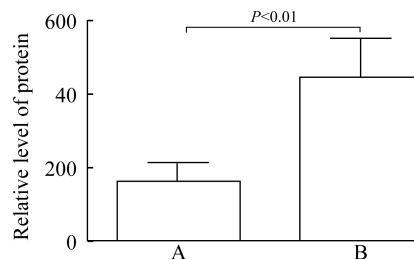
图 1 LPS 刺激的 Raw 264.7 细胞 IL-6 mRNA 相对水平

Fig 1 Relative level of IL-6 mRNA in Raw 264.7 cells stimulated by LPS

LPS 促进 Raw 264.7 细胞 IL-6 蛋白质表达 B 组 IL-6 蛋白质相对水平较 A 组显著升高 (444.89 ± 103.43 vs. 162.08 ± 51.78 , $P < 0.01$), 提示 LPS 能够促进 Raw 264.7 细胞 IL-6 蛋白质表达(图 2)。

LPS 促进 Raw 264.7 细胞 Irak1bp1 mRNA 表达 B 组 Irak1bp1 mRNA 相对水平较 A 组升高 (1.21 ± 0.10 vs. 1.00 ± 0.06 , $P < 0.01$), 提示 LPS 促进 Raw

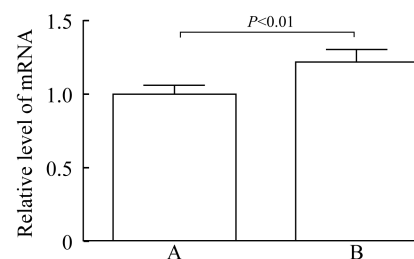
264.7 细胞 Irak1bp1 mRNA 的表达(图 3)。



A: Control group; B: LPS stimulation group.

图 2 LPS 刺激的 Raw 264.7 细胞上清 IL-6 蛋白质相对水平

Fig 2 Relative level of IL-6 protein in the supernatant of Raw 264.7 cells stimulated by LPS



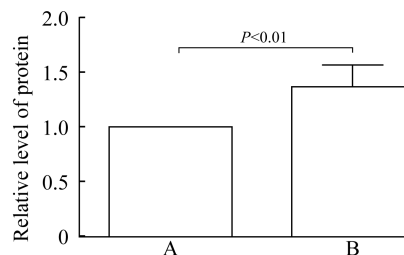
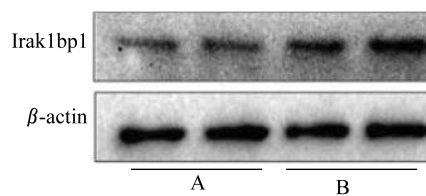
A: Control group; B: LPS stimulation group.

图 3 LPS 刺激的 Raw 264.7 细胞 Irak1bp1 mRNA 相对水平

Fig 3 Relative level of Irak1bp1 mRNA in Raw 264.7 cells stimulated by LPS

LPS 促进 Raw 264.7 细胞 Irak1bp1 蛋白质表达

B 组 Irak1bp1 总蛋白水平较 A 组显著增高 (1.36 ± 0.20 vs. 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$), 提示 LPS 促进 Raw 264.7 细胞 Irak1bp1 总蛋白的表达(图 4)。

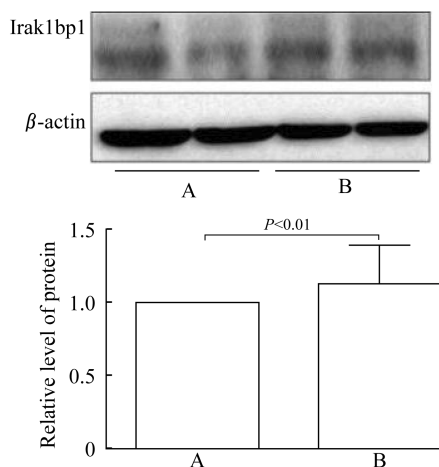


A: Control group; B: LPS stimulation group.

图 4 LPS 刺激的 Raw 264.7 细胞 Irak1bp1 总蛋白相对水平

Fig 4 Relative level of total Irak1bp1 protein in Raw 264.7 cells stimulated by LPS

LPS 单独处理不影响胞质内 Irak1bp1 蛋白质表达 B 组 Raw 264.7 细胞胞质内 Irak1bp1 蛋白质相对水平与 A 组相比差异无统计学意义(1.12 ± 0.27 vs. 1.00 ± 0.00),提示 LPS 单独处理并不影响胞质内 Irak1bp1 蛋白质表达(图 5)。

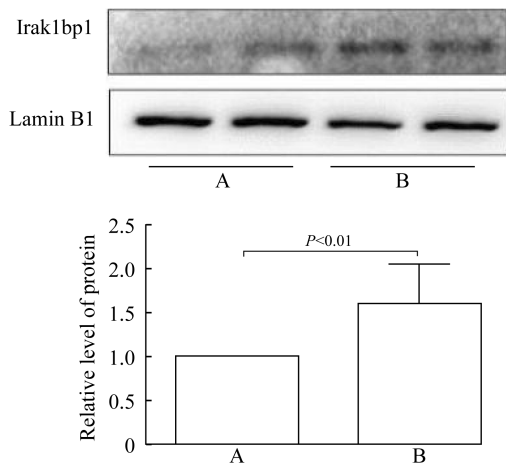


A: Control group; B: LPS stimulation group.

图 5 LPS 刺激的 Raw 264.7 细胞胞质 Irak1bp1 蛋白质相对水平

Fig 5 The relative level of cytoplasmic Irak1bp1 protein in Raw 264.7 cells stimulated by LPS

LPS 促进核内 Irak1bp1 蛋白质表达 B 组 Raw 264.7 细胞 Irak1bp1 浆蛋白相对表达水平较 A 组显著增高(1.61 ± 0.45 vs. 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$),提示 LPS 促进核内 Irak1bp1 蛋白质表达(图 6)。



FigA: Western blot result; Fig B: Relative expression level. A: Control group; B: LPS stimulation group.

图 6 LPS 刺激的 Raw 264.7 细胞胞核内 Irak1bp1 蛋白质相对水平

Fig 6 The relative level of nuclear Irak1bp1 protein in Raw 264.7 cells stimulated by LPS

讨 论

作为重要的免疫细胞之一,巨噬细胞可以依靠其表面的 CD14 分子和 TLR 被 LPS 激活,进而启动 MyD88 依赖和 TRIF 依赖的信号通路^[9],诱导促炎因子释放^[10],在急性肝衰竭^[11-12]、急性胰腺炎^[13]等多种免疫损伤性疾病的发生发展中发挥作用。

Irak1bp1 是 Irak1 蛋白质的结合蛋白,目前对于其功能的研究十分缺乏,仅有的研究显示 Irak1bp1 与炎症关系密切,但是对于炎症反应的具体调控作用及机制仍存在不同的观点^[4-5]。Harrington 团队研究发现 Irak1bp1 能够促进炎症反应,过表达 Irak1bp1 能够促进 IL-6 及 IL-8 的分泌,而且能够增强 TNF- α 诱导的 NF- κ B 激活^[5,7]。进一步研究发现,Irak1bp1 功能发挥可经历以下步骤:(1)磷酸化 Irak1bp1 是 Irak1 蛋白的结合蛋白,也是 Irak1 的磷酸化底物^[14],在 TNF- α 诱导的 NF- κ B 激活过程中,Irak1 首先被 TNF- α 作用而磷酸化^[15],继而磷酸化 Irak1bp1 并促使其入核^[14]。Irak1 催化活性缺失可抑制 Irak1bp1 入核,也能阻断 TNF- α 诱导的 NF- κ B 的激活^[14],Irak1bp1 的磷酸化是其功能发挥的首要步骤。(2)核转位 Irak1bp1 序列中存在与 p65、p50 等入核基因相似的核定位序列,Irak1bp1 磷酸化后进入细胞核,能够增强 NF- κ B p65 亚基的转录激活能力,核定位序列缺失将削弱上述作用^[16],核转位是 Irak1bp1 功能发挥的基础。(3) p65/MED1/Irak1bp1 复合体形成: MED1 是核受体协同刺激因子, p65/MED1/Irak1bp1 复合体的形成有助于 p65 转录激活作用的增强^[17]。然而,Conner 团队却有不同发现, Irak1bp1 在缺失核定位序列时仍然能够调控炎症反应,并且主要起抑制炎症的作用, Irak1bp1 在胞质中与 p105 结合,通过某种途径(目前尚不明确)促使 NF- κ B 抑制性亚基 p50/p50 入核比例增高^[4], p50 及其前体蛋白 p105 又称 NF- κ B1,属于 NF- κ B 家族成员,具有 DNA 结合的能力,但无基因转录激活能力^[18-19]。 p50/p50 入核增多,与 P65/P50 竞争炎症因子结合位点,进而抑制 IL-6 分泌及其抑炎作用^[4]。

为进一步了解 Irak1bp1 蛋白质与炎症反应的关系,本研究采用 LPS 刺激 Raw 264.7 细胞,并研究 Irak1bp1 的表达情况。我们发现 LPS 刺激诱导 Raw 264.7 细胞 IL-6 mRNA 及蛋白质表达的同时

促进 Irak1bp1 mRNA 的表达,通过 Western blot 也发现 LPS 刺激促进 Raw 264.7 细胞分泌 Irak1bp1 蛋白质,提示 Irak1bp1 蛋白质与 TLR 介导的炎症反应关系密切,这与 Conner 等^[6]的研究结果一致。进一步研究显示 LPS 主要使核内 Irak1bp1 蛋白质水平增加,而对胞质内 Irak1bp1 蛋白质水平没有影响,提示 LPS 能够促进 Irak1bp1 进入细胞核,多项研究显示 LPS 能够通过激活 TLR4-MyD88 信号通路激活 IRAK1 蛋白质^[3],这与既往研究结果类似^[14-16],即 IRAK1 磷酸化 Irak1bp1 蛋白质入核并发挥作用。Irak1bp1 对于炎症反应具体的调控作用目前仍不明确,不同研究团队得出的不同观点可能与其研究对象不同、刺激因素及研究的侧重点不同有关,Irak1bp1 的炎症调控作用及调控机制仍然需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] COVERT MW, LEUNG TH, GASTON JE, *et al.* Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation[J]. *Science*, 2005, 309(5742): 1854 - 1857.
- [2] OTA T, SUZUKI Y, NISHIKAWA T, *et al.* Complete sequencing and characterization of 21, 243 full-length human cDNAs[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(1): 40 - 45.
- [3] JIANG Y, TIAN M, LIN W, *et al.* Protein kinase serine/threonine kinase 24 positively regulates interleukin 17-induced inflammation by promoting IKK complex activation[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 921.
- [4] CONNER JR, SMIRNOVA II, MOSEMAN AP, *et al.* IRAK1BP1 inhibits inflammation by promoting nuclear translocation of NF- κ B p50[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(25): 11477 - 11482.
- [5] VIG E, GREEN M, LIU Y, *et al.* SIMPL is a tumor necrosis factor-specific regulator of nuclear factor- κ B activity[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(11): 7859 - 7866.
- [6] CONNER JR, SMIRNOVA II, POLTORAK A. Forward genetic analysis of Toll-like receptor responses in wild-derived mice reveals a novel antiinflammatory role for IRAK1BP1[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(2): 305 - 314.
- [7] BENSON EA, GOEBL MG, YANG F, *et al.* Loss of SIMPL compromises TNF- α dependent survival of hematopoietic progenitors[J]. *Exp Hematol*, 2010, 38(2): 71 - 81.
- [8] LIU LM, LIANG DY, YE CG, *et al.* The UII/UT system mediates upregulation of proinflammatory cytokines through p38 MAPK and NF- κ B pathways in LPS-stimulated Kupffer cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121383.
- [9] SZABO G, BALA S, PETRASEK J, *et al.* Gut-liver axis and sensing microbes[J]. *Dig Dis*, 2010, 28(6): 737 - 744.
- [10] YANG FM, ZUO Y, ZHOU W, *et al.* sNASP inhibits TLR signaling to regulate immune response in sepsis[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(6): 2459 - 2472.
- [11] CHOI JH, PARK SH, JUNG JK, *et al.* Caffeic acid cyclohexylamide rescues lethal inflammation in septic mice through inhibition of I κ B kinase in innate immune process [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41180.
- [12] MA L, GONG X, KUANG G, *et al.* Sesamin ameliorates lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced fulminant hepatic failure by suppression of Toll-like receptor 4 signaling in mice[J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2015, 461(2): 230 - 236.
- [13] SAEKI K, KANAI T, NAKANO M, *et al.* CCL2-induced migration and SOCS3-mediated activation of macrophages are involved in cerulein-induced pancreatitis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(4): 1010 - 1020.
- [14] LUO Y, KWON HJ, MONTANO S, *et al.* Phosphorylation of SIMPL modulates RelA-associated NF- κ B-dependent transcription[J]. *AM J Physiol-Cell Ph*, 2007, 292(3): C1013 - C1023.
- [15] KIM JM, CHO HH, LEE SY, *et al.* Role of IRAK1 on TNF-induced proliferation and NF- κ B activation in human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(1): 49 - 60.
- [16] KWON HJ, BREESE EH, VIG-VARGA E, *et al.* Tumor necrosis factor alpha induction of NF- κ B requires the Novel Coactivator SIMPL [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(21): 9317 - 9326.
- [17] ZHAO W, BREESE E, BOWERS A, *et al.* SIMPL enhancement of tumor necrosis factor- α dependent p65-MED1 complex formation is required for mammalian hematopoietic stem and progenitor cell function[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61123.
- [18] VONDERACH M, BYRNE DP, BARRAN PE, *et al.* DNA binding and phosphorylation regulate the core structure of the NF- κ B p50 transcription factor[J]. *J Am Soc Mass Spectr*, 2019, 30(1): 128 - 138.
- [19] HOFFMANN A, NATOLI G, GHOSH G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module[J]. *Oncogene*, 2006, 25(51): 6706 - 6716.

(收稿日期:2018-01-29;编辑:段佳)