

干扰HSF2对THP-1细胞NLRP3炎症复合体的影响

杨刚, 张峰睿, 李小玉, 牛俊坤, 缪应雷

■背景资料

热休克转录因子2(heat shock transcription factor 2, HSF2)是热休克转录因子家族一员, 前期研究提示其可能为溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)保护性因素, NOD样受体3(NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3, NLRP3)炎症复合体是经典的促炎症小体, 其与UC发生、发展密切联系, 目前国内外尚无HSF2与NLRP3炎症复合体关系的研究。

杨刚, 张峰睿, 李小玉, 牛俊坤, 缪应雷, 昆明医科大学第一附属医院消化内科 云南省昆明市 650031

杨刚, 在读博士, 主要从事炎症性肠病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81160055

作者贡献分布: 杨刚与张峰睿对此文所作贡献均等; 此课题由杨刚、牛俊坤及缪应雷设计; 研究过程由李小玉与张峰睿操作完成; 数据分析由张峰睿完成; 本论文写作由杨刚与张峰睿完成。

通讯作者: 缪应雷, 教授, 主任医师, 650031, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医科大学第一附属医院消化内科。

myldu@sina.com

电话: 0871-65324888

收稿日期: 2015-06-14 修回日期: 2015-07-02

接受日期: 2015-08-17 在线出版日期: 2015-09-18

Effect of HSF2 silencing on NLRP3 inflammasome in THP-1 cells

Gang Yang, Feng-Rui Zhang, Xiao-Yu Li, Jun-Kun Niu, Ying-Lei Miao

Gang Yang, Feng-Rui Zhang, Xiao-Yu Li, Jun-Kun Niu, Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81160055

Correspondence to: Ying-Lei Miao, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, 295 Xichang Road, Kunming 650031, Yunnan Province, China. myldu@sina.com

Received: 2015-06-14 Revised: 2015-07-02

Accepted: 2015-08-17 Published online: 2015-09-18

Abstract

AIM: To study the effect of heat shock transcription factor 2 (HSF2) silencing on NLR family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome in THP-1 cells.

METHODS: THP-1 cells were transfected with

a lentiviral vector (LV-HSF2-RNAi) to induce HSF2 silencing. PMA was used to induce THP-1 cells to differentiate into macrophages. Then different groups of cells were stimulated with lipopolysaccharides (LPS). The mRNA and protein expression levels of NLRP3, ASC, Caspase1 and IL-1 β were measured by RT-PCR and Western Blot, respectively. The level of IL-1 β was measured by ELISA.

RESULTS: The protein level of HSF2 in the HSF2-siRNA group was significantly lower than those in the control group and negative siRNA group ($P < 0.05$). The mRNA and protein expression levels of NLRP3, ASC, Caspase1 and IL-1 β in the HSF2-siRNA group were significantly higher than those in the control group and negative siRNA group ($P < 0.05$). IL-1 β levels in cell supernatants in the HSF2-siRNA group were significantly higher than those in the control group and negative siRNA group (control group: $257.010 \text{ pg/mL} \pm 26.148 \text{ pg/mL}$; siRNA group: $538.800 \text{ pg/mL} \pm 52.250 \text{ pg/mL}$; negative siRNA group: $238.231 \text{ pg/mL} \pm 29.245 \text{ pg/mL}$) ($P < 0.05$).

CONCLUSION: HSF2 silencing significantly raises the mRNA and protein expression of NLRP3 inflammasome and IL-1 β in THP-1 cells.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Heat shock transcription factor 2; RNA interference; THP-1 cells; NLRP3 inflammasome; Inflammatory cytokines

Yang G, Zhang FR, Li XY, Niu JK, Miao YL. Effect of HSF2 silencing on NLRP3 inflammasome in THP-1 cells.

■同行评议者

李慧, 副教授, 复旦大学基础医学病理学系

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2015; 23(26): 4184-4192
 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4184.asp>
 DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i26.4184>

摘要

目的: 通过慢病毒-热休克转录因子2-RNA干扰(lentivirus-heat shock transcription factor 2-RNA interference, LV-HSF2-RNAi)人巨噬细胞系(THP-1), 探讨HSF2对THP-1细胞NOD样受体3(NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3, NLRP3)炎症复合体及其下游白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的影响。

方法: 选用THP-1作为研究对象, 使用慢病毒(LV-HSF2-RNAi)转染THP-1, 干扰其HSF2表达, 使用佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)诱导THP-1细胞分化为巨噬细胞; 将细胞分为对照组与转染组, 使用脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)刺激细胞; 凝胶电泳PCR检测细胞NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis associated speck-like protein containing a CAspase domain, ASC)、半胱氨酸蛋白酶-1(cysteine-requiring aspartate protease-1, Caspase1)、IL-1 β mRNA表达; 蛋白质免疫印迹实验(Western blot)检测细胞NLRP3、ASC、Caspase1、IL-1 β 蛋白表达; 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测细胞培养基内IL-1 β 水平。

结果: Western blot检测HSF2干扰组中HSF2蛋白表达明显低于未转染组和阴性对照组($P<0.05$); PMA诱导THP-1细胞分化, LPS刺激后, 干扰组NLRP3、ASC、Caspase1、IL-1 β mRNA及蛋白表达水平明显高于对照组及干扰对照组($P<0.05$); HSF2干扰组IL-1 β 表达水平明显高于未转染组及阴性对照组($538.800 \text{ pg/mL} \pm 52.250 \text{ pg/mL}$ vs $257.010 \text{ pg/mL} \pm 26.148 \text{ pg/mL}$, $238.231 \text{ pg/mL} \pm 29.245 \text{ pg/mL}$, $P<0.05$)。

结论: 干扰HSF2可以明显提高THP-1细胞NLRP3炎症复合体活化水平, 提高IL-1 β 水平。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 热休克转录因子2; 慢病毒RNA干扰; THP-1细胞; NLRP3炎症复合体; 炎症因子

核心提示: 前期研究提示热休克转录因子2(heat

shock transcription factor 2, HSF2)可能参与溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)发生、发展, NLRP3炎症复合体与UC关系密切, 目前国内暂无HSF2与NOD样受体3(NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3, NLRP3)炎症复合体间关系的研究, 本研究发现低水平HSF2可以促进NLRP3炎症复合体在THP-1细胞内的表达, 促进炎症反应。

杨刚, 张峰睿, 李小玉, 牛俊坤, 缪应雷. 干扰HSF2对THP-1细胞NLRP3炎症复合体的影响. 世界华人消化杂志 2015; 23(26): 4184-4192 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4184.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i26.4184>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种病因不清的世界性医疗难题, 溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是其主要类型, UC是一种以腹痛、腹泻、便血等为临床特征的肠道非特异性炎症疾病, 疾病常反复发作, 病程迁延不愈, 临床需与多种疾病鉴别, 故其诊断十分困难。近年来, 随着我国社会经济水平及医疗水平的不断提高, IBD发病率及患病率不断上升^[1], 其中, UC患病率及发病率远高于CD。在中国, UC在消化系统疾患中已愈发多见, 因疾病诊疗困难, 常使患者出现“因病致穷、因病致残、因病致死”的情况, 而UC高发年龄分布呈双峰状(20-30岁及60-70岁)^[2], 患者多为青壮年及老年人, 造成了越发严重的社会、家庭及医疗负担。

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是细胞在环境高温诱导下, 为了耐受环境变化而产生的一组保护性应激蛋白(stress protein, SP)。2009年, 国外学者研究^[3-6]认为HSPs(HSF1、HSP70)可能通过抑制促炎细胞因子、黏附因子及细胞死亡来达到针对IBD的保护作用。HSPs在细胞氧化应激过程中亦扮演重要角色, 其可通过清除氧化性蛋白质的累积、保护抗氧化酶活性等方面达到保护作用。

HSP基因表达的调节主要发生在转录水平, 而热休克转录因子(heat shock transcription factor, HSF)是HSP基因转录的关键调控因子, 受到广泛关注。真核生物中已发现HSF1、HSF2、HSF3、HSF4四种不同的亚型。其中, HSF1对热刺激敏感, 也是最主要的, 研究最深

■ 研究前沿

炎症反应是UC发生、发展的重要环节, 而NLRP3炎症复合体是固有免疫重要组成部分, 其下游释放的白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)是经典的促炎细胞因子; 经过研究发现, HSF2具有治疗作用, 并有成为UC血清学标志物的潜力。

■ 相关报道

本团队前期研究提示HSF2与UC疾病活动度呈正相关, 且通过细胞研究, 提示HSF2通过影响核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的表达, 从而具有抗炎作用, 在UC发生、发展中可能起到保护作用。

入的应激热休克转录因子, 其功能可能包括抗炎、促进肿瘤发生和维持效应、抗衰老、促进生长发育、调节体温、抗凋亡等^[7,8]。

固有免疫又被称为非特异性免疫, 其作为机体防御的第一道防线, 作用至关重要^[9], 巨噬细胞、单核细胞、上皮细胞等均参与固有免疫, 其中, 吞噬细胞可以通过模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)识别并吞噬侵入机体的病原体, 并向下通过一系列细胞信号传导通路, 激活胞内炎性反应, 释放多种促炎细胞因子, 加剧炎症反应^[10], PRR可位于胞膜[即Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)], 亦可位于胞内[即NOD样受体(NOD-like receptor, NLR)], 二者均可由各种病原相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)激活, PAMP是一类微生物病原体共有的保守组分, 包括磷壁酸(teichoic acid, LTA)、脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)等^[11]。

NOD样受体3(NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3, NLRP3)炎症复合体属于NLR家族, 是迄今为止研究最为明确的炎症体, 其由NLRP3支架、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis associated speck-like protein containing a CARD domain, ASC)及半胱氨酸蛋白酶-1(cysteine-requiring aspartate protease-1, Caspase1)三部分构成。在Caspase1信号途径中起到活化因子的作用^[12]。Caspase1与促炎症反应关系最为密切, 其前体为无活性的酶原pro-Caspase1, 通过其自身的CARD结构域与ASC的CARD结构域结合, 被激活为有活性的Caspase1形式, 而Caspase1又可继续将无活性的pro-白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)剪切激活成为有生物活性的IL-1 β , 最终加剧机体炎症反应^[13]。然而, NLRP3炎症复合体的激活机制尚不明确, 国内外研究提出了三大激活方式, 即细胞内钾离子外流、组织蛋白酶B的释放以及活性氧(reactive oxygen species, ROS)三种方式。其中, ROS介导的NLRP3炎症复合体激活被认为是调控NLRP3激活的关键途径^[14-17]。

2008年, 本研究小组采用高通量基因芯片, 发现对于UC患者与健康对照组而言, 在外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中, HSF2为差异表达的基因, 差异达2倍以上。2010年, 利用蛋白组学双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis,

2-DE)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-massspectrometry, MALDI-TOF-MS)发现在UC患者与健康对照者血清中, HSF2蛋白表达存在明显差异^[18]。上述一系列研究均提示HSF2可能与UC的发生、发展相关, 有成为全新UC诊断标志物的潜力。

目前, 国内外暂无HSF2与NLRP3炎症复合体间关系的研究, 故为进一步探索HSF2在UC发生、发展中对机体固有免疫及氧化应激的作用和机制, 本课题通过培养人巨噬细胞系THP-1细胞, 经PMA诱导分化为巨噬细胞后, 使用LPS刺激细胞, 模拟炎性环境, 采用慢病毒RNA干扰技术, 比较正常水平和低水平HSF2对巨噬细胞NLRP3炎症复合体及其下游IL-1 β 的影响, 为UC的诊治研究提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料 THP-1细胞受赠于中国科学院昆明动物研究所, 采用RPMI 1640培养液及10%胎牛血清(HyClone, USA)于37℃、50 mL/L CO₂细胞培养箱内培养; 佛波酯及脂多糖购自Thermo公司; HSF2干扰慢病毒(lentivirus-heat shock transcription factor 2-RNA interference, LV-HSF2-RNAi)及慢病毒阴性对照购自中国吉凯基因化学技术有限公司; 总RNA抽提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; cDNA第一链合成试剂盒购自TaKaRa公司; NLRP3、ASC、Caspase1及IL-1 β 引物序列于GenBank查询后由深圳华大基因公司负责完成合成; HSF2抗体(sc-13056)购自Santa Cruz公司; NLRP3(D2P5E)(13158)、ASC(E1E3I)(13833)、Caspase1(D7F10)(3866)及pro-IL-1 β (D3U3E)(12703)抗体购自CST公司; β -actin(60008-1-Ig)购自Proteintech公司; PVDF膜购自Millipore, Billerica公司; 蛋白电泳marker及免疫印迹发光显色底物购自Thermo公司; X光片、显影液、定影液购自Eastman Kodak公司; IL-1 β Elisa试剂盒购自中国欣博盛生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 以常规技术行细胞培养, 3-4 d换液1次。以生长情况作为传代依据, 按1:2-1:3比例传代。

1.2.2 慢病毒干扰细胞HSF2表达: 上海吉凯基

表 1 PCR引物列表

引物名称	序列	扩增大小(bp)
NLRP3	F: 5'-TCTCTAGCTGTTCTGAGGCTG-3' R: 5'-TAGGCTTCGGTCCACACAGAAA-3'	228
ASC	F: 5'-TCTACCTGGAGACCTACGGC-3' R: 5'-TCCAGAGCCCTGGTGC-3'	108
Caspase1	F: 5'-GCCTGTTCTGTGATGTGGA-3' R: 5'-TTCACCTTCCTGCCACAGAC-3'	175
IL-1 β	F: 5'-CAACAGGCTGCTCTGGGATT-3' R: 5'-GTCCTGGAAGGAGCACTTCAT-3'	118
GAPDH	F: 5'-GGA AGGTGAAGGTCGGAGTC-3' R: 5'-TCAGCCTTGACGGTGCCATG-3'	285

NLRP3: NOD样受体3; ASC: 凋亡相关斑点样蛋白; Caspase1: 半胱氨酸蛋白酶-1; IL-1 β : 白介素-1 β .

应用要点

本研究进一步揭示HSF2在炎症反应中的作用, 为将来HSF2的基础研究提供理论依据。

因化学技术有限公司购买1组RNA干扰慢病毒(hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin)以及1组阴性对照慢病毒(All Negative Control)转染入细胞, 通过荧光显微镜观察干扰效率, 通过Western blot验证干扰效果, 以确保后续实验。慢病毒转染按照产品说明书进行, 荧光显微镜下观察GFP表达情况, 评估转染效率, 并进行后续实验。

实验细胞分组: 未转染组(Control): 经160 nmol/L PMA诱导分化为巨噬细胞^[19], 后用100 ng/mL LPS处理细胞; 干扰对照组(Negative siRNA): 转染入阴性对照慢病毒, 经160 nmol/L PMA诱导分化为巨噬细胞, 后用100 ng/mL LPS处理细胞; 干扰组(siRNA): 转染入RNA干扰慢病毒, 经160 nmol/L PMA诱导分化为巨噬细胞, 后用100 ng/mL LPS处理细胞。

1.2.3 Western blot检测NLRP3、ASC、Caspase1、IL-1 β 蛋白表达: (1)THP-1细胞蛋白提取: 将各组细胞培养板置于冰上, 吸尽原培养液。使用PBS充分洗涤, 重复3遍; 向细胞培养板孔内加入电泳上样缓冲液(2 \times), 均匀刮细胞, 将刮取后的细胞移至1.5 mL离心管中, 后在沸水中煮15-20 min, 使细胞蛋白充分受热变性; -20 $^{\circ}$ C低温冰箱保存; (2)蛋白含量测定: 按试剂盒(BCA Protein Assay Kit)说明书操作, 根据标准曲线计算蛋白浓度; (3)Western blot: 按照SDS-PAGE电泳、转膜(湿转)、封闭及抗体孵育、目的蛋白条带显影及结果分析等步骤顺序完成。运用Image J软件行条带灰度分析比较。

1.2.4 凝胶电泳PCR检测NLRP3、ASC、

Caspase1、IL-1 β mRNA水平: (1)提取细胞总RNA: 使用天根RNA Simple Total RNA kit试剂盒提取THP-1细胞总RNA并使用紫外分光光度计测定RNA浓度, 严格保证后续试验mRNA浓度一致; (2)cDNA逆转录: 依照Takara Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H-)试剂盒说明书完成cDNA逆转录, 合成的cDNA立即-20 $^{\circ}$ C保存; (3)引物设计: 依据GenBank中人NLRP3、ASC、Caspase1、IL-1 β 和GAPDH的基因序列, 利用Primer Premier 5.0软件设计引物, 引物由华大基因公司合成(表1); (4)待测样品凝胶电泳PCR: 根据TaKaRa Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H-)试剂盒说明书配置cDNA样品凝胶电泳PCR反应体系, 后将其上PCR机, 反应条件为: 预变性: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 变性: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 退火: 55 $^{\circ}$ C 30 s; 延伸: 72 $^{\circ}$ C 3 min; 共30个循环; 补平: 72 $^{\circ}$ C 10 min; (5)PCR产物分析: 配置2%琼脂糖凝胶, 取20 μ L上述PCR产物, 依次上样, 样品孔两侧加DNA marker。90 V电压下电泳至溴酚兰指示剂离胶底0.5 cm。仔细观察条带, 根据DNA marker确定目标条带, 及时拍照记录。运用Image J软件行条带灰度分析比较。

1.2.5 酶联免疫吸附试验: 收集不同分组细胞上清, 分装至不同离心管中按Human IL-1 β ELISA试剂盒说明书检测细胞因子, 测定 A_{450} 值。保存结果。

统计学处理 实验数据均来源至少3次独立实验, 有可重复性。所有数据采用SPSS19.0软件进行统计分析, 计量资料数据经正态检

同行评价

本研究有一定的前期工作基础, 在HSF和IBD的关系研究中有不少积累, 国内外暂无HSF2与NLRP3炎症复合体间关系的研究, 故新颖性突出, 为HSF2在UC发生、发展中可能的机制提供了新的理论依据。

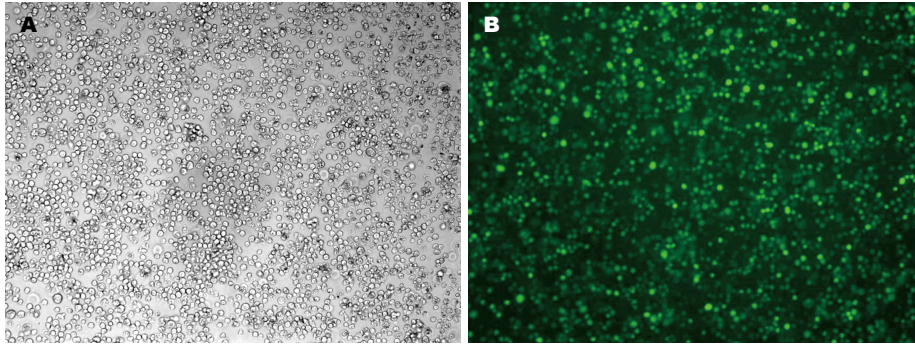


图1 THP-1细胞慢病毒转染检测(荧光显微镜×10). A: 转染组白光镜下; B: 转染组荧光镜下.

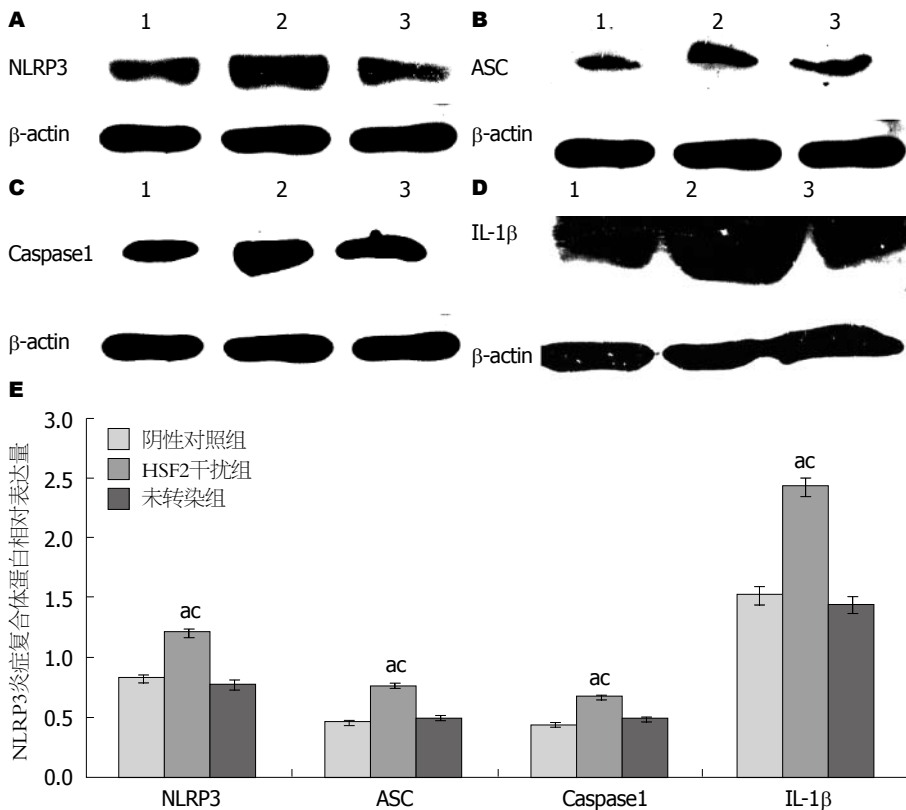


图2 NLRP3炎症复合体蛋白水平变化. A: NLRP3; B: ASC; C: Caspase1; D: IL-1β; E: NLRP3炎症复合体蛋白相对表达量. ^a $P<0.05$ vs 阴性对照组; ^c $P<0.05$ vs 未转染组. NLRP3: NOD样受体3; ASC: 凋亡相关斑点样蛋白; Caspase1: 半胱氨酸蛋白酶-1; IL-1β: 白介素-1β.

验均为正态分布, 用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 多组间计量资料的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

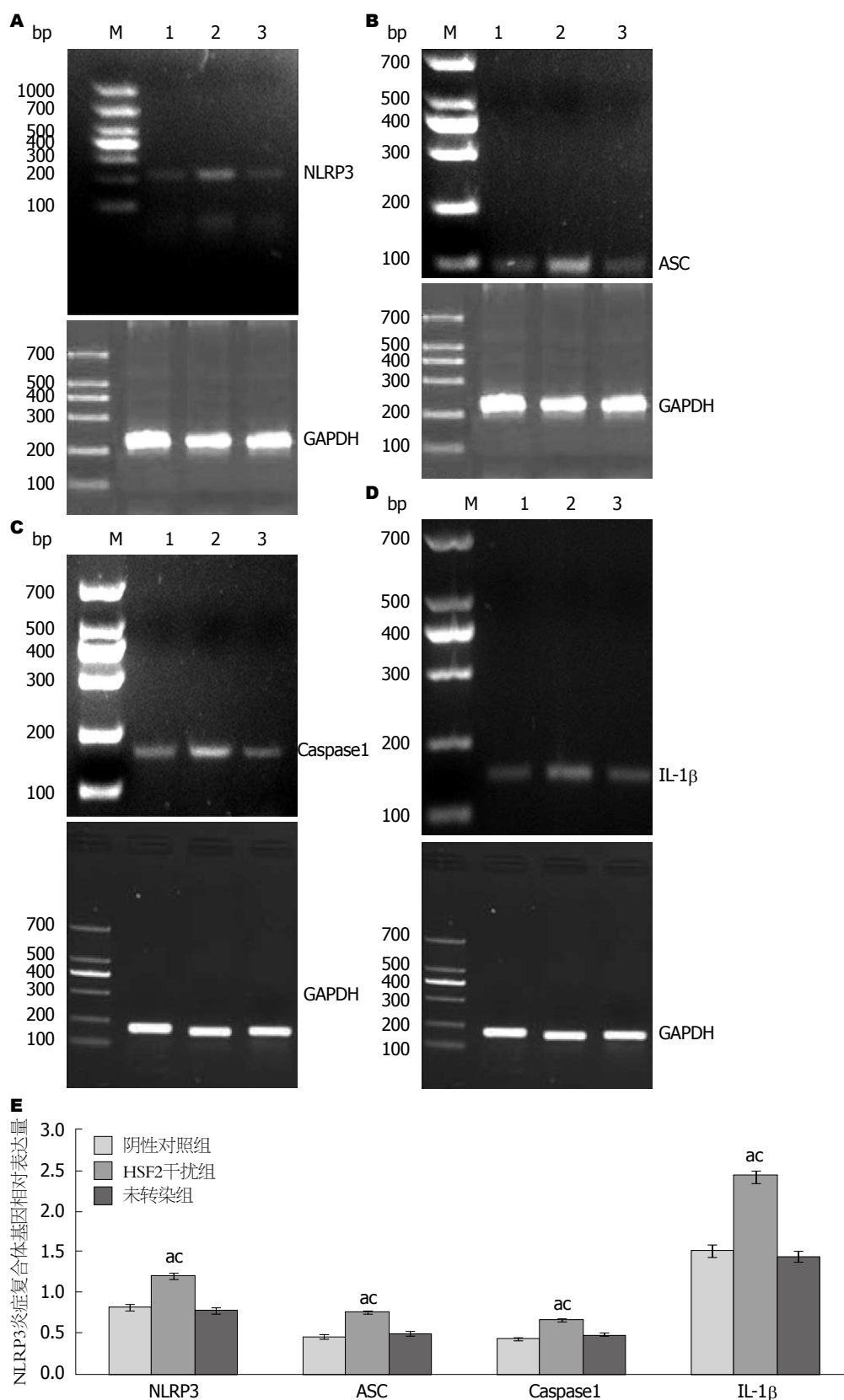
2 结果

2.1 慢病毒干扰后HSF2表达水平变化 倒置荧光显微镜观察GFP表达情况, 结果提示转染组(HSF2干扰组+慢病毒阴性对照组)可见明显GFP表达, 转染效率 $>80\%$ (图1). Western blot检测HSF2蛋白干扰情况显示转染入慢病毒(LV-HSF2-RNAi)细胞的HSF2蛋白质水平较未转染

组(Control)及阴性对照组(Negative siRNA)显著减少($F=1609.351$, $P<0.05$).

2.2 干扰HSF2后NLRP3炎症复合体蛋白及mRNA水平变化 HSF2干扰组NLRP3、ASC、Caspase1及IL-1β蛋白表达水平和mRNA表达水平明显高于阴性对照组及未转染组($P<0.05$)(图2, 3).

2.3 干扰HSF2后THP-1细胞培养基中IL-1β蛋白水平变化 ELISA标准曲线相关系数 $R>0.98$, 曲线线性佳. 在细胞培养基内IL-1β水平的比较中, HSF2干扰组($638.800 \text{ pg/mL} \pm 62.250 \text{ pg/mL}$)明



显较未转染组(357.010 pg/mL±36.148 pg/mL) 及阴性对照组(338.231 pg/mL±39.245 pg/mL)

升高($P<0.05$).

3 讨论

免疫紊乱是UC病因学中重要的组分, 固有免疫作为机体免疫的第一道防线, 其功能状态与UC的发生、发展关系密切, 近年来, NLR作为固有免疫的重要成员, 愈发受到重视, 其中, 目前研究最为清晰的当属NLRP3炎症复合体, 然而, 作为机体重要的抗损伤组分HSP, 其与固有免疫间的关系, 鲜有报道. 作为UC患者与正常对照者间的差异表达蛋白, HSF2在UC发生、发展中的作用受到我们研究团队的重视, 在本团队相关研究中发现, HSF2在UC患者中与疾病严重程度有关, 随着UC病情的增重, HSF2表达也逐渐增加^[20]. 在与肠结核、克罗恩病、肠淋巴瘤等需鉴别的疾病对比中, 发现HSF2在UC患者黏膜表达明显高于其他疾病^[21]. 一系列研究提示HSF2与UC关系密切, 参与了UC的发生发展过程, 能间接反映炎症程度, 其表达量可作为判断UC病情严重程度及治疗疗效的指标之一. 本研究在UC患者与正常对照患者HSF2不同水平表达的理论基础上, 通过PMA诱导THP-1细胞转化为巨噬细胞, 经LPS刺激, 模拟炎性环境, 使用慢病毒干扰沉默技术, 比较不同HSF2水平对巨噬细胞内NLRP3炎症复合体的影响, 试图探寻HSF2与机体固有免疫间的关系. 结果显示干扰HSF2能明显提高LPS诱导的巨噬细胞内NLRP3炎症复合体各组分及其下游IL-1 β 的基因、蛋白表达水平, 明显促进炎症反应.

固有免疫细胞通过PRRs模式识别病原体携带的病原相关分子模式(PAMP), 从而启动免疫反应, 其中, TLR位于胞膜, 而NLR位于胞质, NLRP3炎症复合体是NLR家族内最为典型的组分, 其由NLRP3骨架、ASC及Caspase1组成. 目前研究提示, NLRP3炎症复合体的激活主要通过三种方式(细胞内钾离子外流、释放组织蛋白酶B及ROS), 受PAMP刺激并激活后的NLRP3骨架与ASC结合, 从而剪切无活性的pro-Caspase1转变为活性体Caspase1, Caspase1又可继续剪切无活性的pro-IL-1 β 转变为活性体IL-1 β , 从而参与炎症反应. IL-1 β 是诱导IBD肠道炎症的一种极为重要的细胞因子, 他与抗原协同作用, 使CD4⁺ T细胞活化, IL-2R表达, 促进B细胞生长和活化, 促进单核巨噬细胞等抗

原提呈细胞的抗原表达, 引起炎症介质释放^[22]. 一系列临床或基础研究^[23-27]均提示, IL-1 β 与UC的发生、发展关系密切.

NLRP3炎症复合体的激活包括预激与活化两个步骤, 其中, 预激步骤在PAMP刺激细胞后, 由诱导核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)主导活化, 上调pro-IL-1 β 和NLRP3基因与蛋白表达, 为NLRP3炎症复合体的激活提供准备, 而NF- κ B的预激对NLRP3炎症复合体的激活至关重要^[28]. 对IBD起主要致病作用的细胞因子如IL-1 β 、TNF- α 、IL-8等在转录水平均由NF- κ B调控^[29-31], 其重要程度不言而喻. 本团队前提研究^[25]提示, 在Caco-2细胞中, 干扰HSF2后, 明显提高了细胞NF- κ B活化程度.

IL-1家族包括IL-1 α 、IL-1 β 及IL-1受体拮抗剂(IL-1Ra), 其中, IL-1 β 是IL-1家族中的重要活性组分, 其可以诱导细胞内皮活化, 刺激中性粒细胞合成并释放炎症介质, 直接参与了机体炎症发生过程, 在其中起到了明显的致炎作用^[32]. 国外研究^[32-36]提示, IL-1 β mRNA水平与不同的UC疾病程度呈正相关, IL-1 β 基因多态性则与UC病程及疾病活动程度相关, 而对于UC患者IL-1 β 升高机制方面, 则提出其原因可能来自于UC患者结肠巨噬细胞受刺激后, 增加了IL-1 β 向结肠上皮细胞的分泌, 加剧了结肠上皮细胞炎症. 如前文所述, NLRP3炎症复合体参与了IL-1 β 的活化及分泌过程, 故本研究希望通过慢病毒干扰技术, 降低THP-1细胞HSF2表达, 探讨低水平HSF2对巨噬细胞NLRP3炎症复合体及其下游IL-1 β 的影响, 进一步寻找HSF2与炎症发生、发展间的关系.

在本研究中, 干扰THP-1细胞HSF2表达后, 采用了凝胶电泳PCR技术检测NLRP3、ASC、Caspase1及pro-IL-1 β mRNA表达, 发现HSF2干扰组基因表达水平均较阴性对照组及未转染组明显提高($P<0.05$); 采用Western blot技术检测NLRP3、ASC、Caspase1及pro-IL-1 β 蛋白表达, 同样发现HSF2干扰组蛋白表达水平均较阴性对照组及未转染组明显提高($P<0.05$); 采用ELISA技术检测细胞培养基内IL-1 β 蛋白表达, HSF2干扰组表达量亦明显高于阴性对照组及未转染组, 结合本研究团队前期研究结果, 我们推测, HSF2对NLRP3炎症复合体的影响机制可能来源于低水平HSF2增强了NF- κ B的活化程度, 从而促进了NF- κ B

对NLRP3炎症复合体的预激,上调了pro-IL1 β 及NLRP3基因及蛋白水平,在充分预激的基础上,通过增强某种NLRP3活化途径,提高了NLRP3炎症复合体活化水平,引起NLRP3炎症复合体各组分及其下游IL-1 β 基因与蛋白表达水平提高,加重炎症反应。

总之,目前国内外尚无HSF2对NLRP3炎症复合体影响的研究,在本研究中,发现HSF2与固有免疫中的NLRP3炎症复合体及其下游IL-1 β 关系密切,低水平HSF2有助于提高NLRP3炎症复合体组分基因及蛋白表达,从而增加其下游IL-1 β 的表达,促进机体炎症反应,然而,NLRP3炎症复合体活化途径目前尚无定论,如上所述包括细胞内钾离子外流、释放组织蛋白酶B及ROS三种可能,HSF2与NLRP3炎症复合体的三种活化途径间的关系,仍需进一步研究探索。

HSP作为机体保护自身免受应激损伤所产生的物质,其保护性作用得到学者广泛认同^[37-40],结合课题组的前期研究,我们认为:在UC发生、发展中,病变肠道黏膜受到外界刺激,肠黏膜细胞及免疫细胞接受PAMP刺激,在NF- κ B预激作用下,NLRP3炎症复合体被活化,其下游IL-1 β 释放量增加,从而产生免疫反应和炎症,当发生上述损害时,机体为了抵抗并耐受这一反应,肠上皮细胞及巨噬细胞发生自我保护,其中应当包含对HSFs家族的激活,使其调控胞内外多种信号传导通路,发挥抗炎作用。本课题组已通过一系列实验证实UC患者HSF2基因与蛋白表达明显较正常对照者升高,本实验又从THP-1细胞水平发现低水平HSF2可以促进NLRP3炎症复合体基因及蛋白表达,从而增加其下游IL-1 β 的表达,体现了干扰HSF2对THP-1细胞NLRP3炎症复合体的影响,这一系列研究提示HSF2在UC的发生、发展中起到了重要作用,为UC的诊治提供了一种新的思路。

4 参考文献

- 1 Zeng Z, Zhu Z, Yang Y, Ruan W, Peng X, Su Y, Peng L, Chen J, Yin Q, Zhao C, Zhou H, Yuan S, Hao Y, Qian J, Ng SC, Chen M, Hu P. Incidence and clinical characteristics of inflammatory bowel disease in a developed region of Guangdong Province, China: a prospective population-based study. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28: 1148-1153 [PMID: 23432198 DOI: 10.1111/jgh.12164]
- 2 Sonnenberg A. Age distribution of IBD hospitalization. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 452-457 [PMID: 19714765 DOI: 10.1002/ibd.21058]

- 3 Gil Del Valle L. Withdrawn: Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans. *Biomed Pharmacother* 2010 Sep 25. [Epub ahead of print] [PMID: 20950991]
- 4 Singh U, Bongcam-Rudloff E, Westermark B. A DNA sequence directed mutual transcription regulation of HSF1 and NFIX involves novel heat sensitive protein interactions. *PLoS One* 2009; 4: e5050 [PMID: 19337383 DOI: 10.1371/journal.pone.0005050]
- 5 Vanhooren V, Liu XE, Desmyter L, Fan YD, Vanwalleghem L, Van Molle W, Dewaele S, Praet M, Contreras R, Libert C, Chen C. Over-expression of heat shock protein 70 in mice is associated with growth retardation, tumor formation, and early death. *Rejuvenation Res* 2008; 11: 1013-1020 [PMID: 19072255 DOI: 10.1089/rej.2008.0783]
- 6 Khaleque MA, Bharti A, Gong J, Gray PJ, Sachdev V, Ciocca DR, Stati A, Fanelli M, Calderwood SK. Heat shock factor 1 represses estrogen-dependent transcription through association with MTA1. *Oncogene* 2008; 27: 1886-1893 [PMID: 17922035]
- 7 吴畅, 任安经, 袁文俊, 林丽. 热休克转录因子1的抗炎作用. *生理科学进展* 2008; 39: 151-154
- 8 Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 545-555 [PMID: 20628411 DOI: 10.1038/nrm2938]
- 9 Medzhitov R, Janeway C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000; 173: 89-97 [PMID: 10719670]
- 10 Franchi L, McDonald C, Kanneganti TD, Amer A, Núñez G. Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors: intracellular pattern recognition molecules for pathogen detection and host defense. *J Immunol* 2006; 177: 3507-3513 [PMID: 16951308]
- 11 Hoffman HM, Wanderer AA. Inflammasome and IL-1 β -mediated disorders. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010; 10: 229-235 [PMID: 20425006 DOI: 10.1007/s11882-010-0109-z]
- 12 Bauernfeind F, Hornung V. Of inflammasomes and pathogens--sensing of microbes by the inflammasome. *EMBO Mol Med* 2013; 5: 814-826 [PMID: 23666718 DOI: 10.1002/emmm.201201771]
- 13 Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, Warren SE, Wewers MD, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol* 2010; 11: 1136-1142 [PMID: 21057511 DOI: 10.1038/ni.1960]
- 14 Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 210-215 [PMID: 20168318 DOI: 10.1038/nri2725]
- 15 Lane T, Flam B, Lockey R, Kolliputi N. TXNIP shuttling: missing link between oxidative stress and inflammasome activation. *Front Physiol* 2013; 4: 50 [PMID: 23520439 DOI: 10.3389/fphys.2013.00050]
- 16 Zhang Z, Zhang ZY, Wu Y, Schluesener HJ. Immunolocalization of Toll-like receptors 2 and 4 as well as their endogenous ligand, heat shock protein 70, in rat traumatic brain injury. *Neuroimmunomodulation* 2012; 19: 10-19 [PMID: 22067617 DOI: 10.1159/000326771]

- 17 Shi H, Zhang Z, Wang X, Li R, Hou W, Bi W, Zhang X. Inhibition of autophagy induces IL-1 β release from ARPE-19 cells via ROS mediated NLRP3 inflammasome activation under high glucose stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 463: 1071-1076 [PMID: 26102024 DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.060]
- 18 廖应雷, 肖玉良, 段丽平, 李晓燕, 陈丽芳, 李红纳. 寡聚核苷酸芯片检测溃疡性结肠炎患者基因表达谱的研究. *中华消化杂志* 2009; 29: 1-3
- 19 王术玲, 潘华新, 王培训. THP-1巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立及鉴定. *中药新药与临床药理* 2009; 20: 281-284
- 20 朱艳平. HSF2和ApoC-III在溃疡性结肠炎结肠黏膜表达的研究. 昆明: 昆明医学院, 2011
- 21 童明霞. HSF2和ApoC-III在溃疡性结肠炎诊断及鉴别诊断中的研究. 昆明: 昆明医科大学, 2012
- 22 徐燕, 彭湘君, 刘昭文. 溃疡性结肠炎中肠黏膜免疫细胞因子作用的研究进展. *赣南医学院学报* 2011; 31: 157-159
- 23 Chen WN, Liu LL, Jiao BY, Lin WS, Lin XJ, Lin X. Hepatitis B virus X protein increases the IL-1 β -induced NF- κ B activation via interaction with evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways (ECSIT). *Virus Res* 2015; 195: 236-245 [PMID: 25449573 DOI: 10.1016/j.virusres.2014.10.025]
- 24 Wei DD, Lin XH, Wang HC, Wang B, Bai CY, Wang YQ, Li GE, Ren XQ. [Apocynin relieves inflammation in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis mice: the role of NOXs-ROS-p38MAPK pathway]. *Shengli Xuebao* 2015; 67: 74-82 [PMID: 25672629]
- 25 Miao J, Niu J, Wang K, Xiao Y, Du Y, Zhou L, Duan L, Li S, Yang G, Chen L, Tong M, Miao Y. Heat shock factor 2 levels are associated with the severity of ulcerative colitis. *PLoS One* 2014; 9: e88822 [PMID: 24533153 DOI: 10.1371/journal.pone.0088822]
- 26 Sakthivel KM, Guruvayoorappan C. Protective effect of Acacia ferruginea against ulcerative colitis via modulating inflammatory mediators, cytokine profile and NF- κ B signal transduction pathways. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2014; 33: 83-98 [PMID: 24941292]
- 27 Wu P, Guo Y, Jia F, Wang X. The Effects of Armillarisin A on Serum IL-1 β and IL-4 and in Treating Ulcerative Colitis. *Cell Biochem Biophys* 2014 Nov 25. [Epub ahead of print] [PMID: 25420534]
- 28 Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E. Cutting edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 2009; 183: 787-791 [PMID: 19570822 DOI: 10.4049/jimmunol.0901363]
- 29 Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107: 7-11 [PMID: 11134171]
- 30 Moynagh PN. The NF- κ B pathway. *J Cell Sci* 2005; 118: 4589-4592 [PMID: 16219681]
- 31 Jobin C, Sartor RB. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: C451-C462 [PMID: 10712233]
- 32 Ashwood P, Harvey R, Verjee T, Wolstencroft R, Thompson RP, Powell JJ. Functional interactions between mucosal IL-1, IL-ra and TGF-beta 1 in ulcerative colitis. *Inflamm Res* 2004; 53: 53-59 [PMID: 15021969]
- 33 Bamba T, Yamamoto T, Umegae S, Matsumoto K. Effects of preoperative leukocytapheresis on inflammatory cytokines following surgery for ulcerative colitis: a prospective randomized study. *J Clin Apher* 2014; 29: 107-112 [PMID: 24000140 DOI: 10.1002/jca.21299]
- 34 Wang S, Zhou T, Zhai JP, Wang LH, Chen J. Effects of modified Sanhuang decoction () enema on serum tumor necrosis factor- α and colonic mucosa interleukin-1 β , interleukin-6 levels in ulcerative colitis rats. *Chin J Integr Med* 2014; 20: 865-869 [PMID: 24126972 DOI: 10.1007/s11655-013-1538-z]
- 35 Dahlén R, Magnusson MK, Bajor A, Lason A, Ung KA, Strid H, Öhman L. Global mucosal and serum cytokine profile in patients with ulcerative colitis undergoing anti-TNF therapy. *Scand J Gastroenterol* 2015; 50: 1118-1126 [PMID: 25877762 DOI: 10.3109/00365521.2015.1031167]
- 36 Yamamoto-Furusho JK, Santiago-Hernández JJ, Pérez-Hernández N, Ramírez-Fuentes S, Frago JM, Vargas-Alarcón G. Interleukin 1 β (IL-1B) and IL-1 antagonist receptor (IL-1RN) gene polymorphisms are associated with the genetic susceptibility and steroid dependence in patients with ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: 531-535 [PMID: 20975573 DOI: 10.1097/MCG.0b013e3181faec51]
- 37 Tanaka K, Namba T, Arai Y, Fujimoto M, Adachi H, Sobue G, Takeuchi K, Nakai A, Mizushima T. Genetic evidence for a protective role for heat shock factor 1 and heat shock protein 70 against colitis. *J Biol Chem* 2007; 282: 23240-23252 [PMID: 17556362]
- 38 Schilling D, Kühnel A, Tetzlaff F, Konrad S, Multhoff G. NZ28-induced inhibition of HSF1, SP1 and NF- κ B triggers the loss of the natural killer cell-activating ligands MICA/B on human tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 2015; 64: 599-608 [PMID: 25854583 DOI: 10.1007/s00262-015-1665-9]
- 39 Ferns JE, Theisen CS, Fibuch EE, Seidler NW. Protection against protein aggregation by alpha-crystallin as a mechanism of preconditioning. *Neurochem Res* 2012; 37: 244-252 [PMID: 21984199 DOI: 10.1007/s11064-011-0601-4]
- 40 Lecomte S, Desmots F, Le Masson F, Le Goff P, Michel D, Christians ES, Le Dréan Y. Roles of heat shock factor 1 and 2 in response to proteasome inhibition: consequence on p53 stability. *Oncogene* 2010; 29: 4216-4224 [PMID: 20498630 DOI: 10.1038/onc.2010.171]

编辑: 郭鹏 电编: 闫晋利

