



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.09.011

http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.09.011

Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(9):1291-1295.

· 基础研究 ·

HSF-1 在 HMGB1 诱导的炎症反应中的作用

尹朝奇, 贺全勇, 罗成群, 周建大, 陈佳, 李萍, 朱颖, 彭浩, 徐阳成, 陶如意

(中南大学湘雅三医院 烧伤整形科, 湖南 长沙 410013)

摘要

目的: 探讨热休克转录因子 1 (HSF-1) 在高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 所诱导的炎症反应中的作用。
方法: 不同浓度 HMGB1 作用于 RAW264.7 细胞不同时间后, 用 ELISA 法检测细胞上清液 TNF- α 水平; 分别用免疫荧光法与 Western blot 法检测 HMGB1 作用后, RAW264.7 细胞 NF- κ B 核转移情况与 HSF-1 表达。观察干扰 HSF-1 表达后, HMGB1 诱导 RAW264.7 细胞 TNF- α 表达的变化。
结果: HMGB1 作用后, RAW264.7 细胞分别在 4、12 h 出现两次 TNF- α 分泌高峰, 且 TNF- α 的释放量随 HMGB1 浓度的增加而增加。HMGB1 作用后, RAW264.7 细胞的 NF- κ B 核转移明显增强, HSF-1 表达明显增加 (均 $P < 0.05$)。干扰 HSF-1 表达后, HMGB1 诱导 RAW264.7 细胞产生的 TNF- α 量较未干扰的 RAW264.7 细胞明显增加 ($P < 0.05$)。
结论: HMGB1 能诱导 RAW264.7 细胞的炎症反应与 HSF-1 的表达, 但 HSF-1 可能对 HMGB1 诱导的炎症反应有负反馈性抑制作用。

关键词

胰腺炎, 急性坏死性; 全身炎症反应综合征; 高迁移率族蛋白质类; 热休克转录因子 1
中图分类号: R657.5

Role of HSF-1 in inflammatory response induced by HMGB1

YIN Chaoqi, HE Quanyong, LUO Chengqun, ZHOU Jianda, CHEN Jia, LI Ping, ZHU Jie, PENG Hao, XU Yangcheng, TAO Ruyi

(Department of Burns and Plastic Surgery, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract

Objective: To investigate the role of heat shock transcription factor 1 (HSF1) in inflammatory response induced by high mobility group protein B1 (HMGB1).
Methods: The TNF- α contents in the supernatants of RAW264.7 cells after exposure to different concentrations of HMGB1 for different times were determined by ELISA assay. The NF- κ B nuclear translocation and HSF-1 expression in RAW264.7 cells after HMGB1 treatment were examined by immunofluorescence and Western blot, respectively. The change in TNF- α expression induced by HMGB1 in RAW264.7 cells after interference of HSF-1 expression was observed.
Results: RAW264.7 cells presented two peaks of TNF- α release at 4 and 12 h respectively after HMGB1 treatment, and the TNF- α release level was increased with the elevation of HMGB1 concentration. The NF- κ B nuclear translocation was significantly enhanced and HSF-1 expression was significantly increased in RAW264.7 cells after HMGB1 treatment (both $P < 0.05$). The TNF- α expression induced by HMGB1 in RAW264.7 cells

基金项目: 湖南省卫生厅科研基金资助项目 (B2012-030)。

收稿日期: 2016-04-25; 修订日期: 2016-08-13。

作者简介: 尹朝奇, 中南大学湘雅三医院副主任医师, 主要从事创面修复方面的研究。

通信作者: 尹朝奇, Email: yinchaoqi@163.com

after interference of HSF-1 expression was significantly increased compared with RAW264.7 cells without HSF-1 interference ($P < 0.05$).

Conclusion: HMGB1 can induce inflammatory response and HSF-1 expression in RAW264.7 cells, but HSF-1 may play a negative feedback inhibitory role in the HMGB1-induced inflammation.

Key words: Pancreatitis, Acute Necrotizing; Systemic Inflammatory Response Syndrome; High Mobility Group Proteins; Heat Shock Transcription Factor 1

CLC number: R657.5

急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 是临床常见的急腹症, 其中 20%~25% 的患者临床上病情重, 可出现局部或全身并发症, 出现多器官功能衰竭, 甚至危及生命^[1], SAP 的发病机制是一个复杂的、多因素参与的病理生理过程, 这些因素相互作用、相互影响, 至今尚未完全阐明^[2]。众多学说中, “胰酶自身消化学说” 是 AP 最基本的发病机制^[3], “炎症因子学说” 也被广泛接受^[4]。这些机制综合作用导致全身性炎症反应的病理过程, 进一步刺激已经活化的巨噬细胞产生过量炎症因子, 对胰腺等脏器形成二次打击, 严重者可出现多器官功能衰竭^[5]。

热休克转录因子 1 (HSF-1) 在无活性状态下存在于胞浆中, 在应激状态下转变为有活性的三聚体形态, 转移入细胞核, 启动热休克蛋白 (HSP) 的转录, 后者是重要的分子伴侣, 可以在多层面保护细胞, 减轻打击所带来的伤害, 在细胞的内源性保护中起重要作用^[6]。

HSF-1 本身对炎症反应也存在着一一定的抑制作用^[7]。高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 是一类存在于细胞核中的非组蛋白, 在炎症反应的晚期可主动分泌或被动释放出胞^[8]。是重要的晚期炎症因子^[9-10], 另外, 还有研究^[11-12]表明 HMGB1 预处理可以诱导产生免疫耐受。目前尚不清楚 HMGB1 是否可以诱导 HSF-1 的活化。本实验旨在研究 HSF-1 在 HMGB1 诱导的炎症反应中的表达和作用, 为控制急性胰腺炎的炎症因子过度释放及全身性炎症反应寻找有干预效靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与 siRNA 干扰

鼠单核/巨噬细胞 RAW264.7 购自中南大学湘雅医院细胞中心, 常规复苏细胞接种于含 10% 胎牛血清 (Sigma) 的高糖培养基 (Sigma) 中, 置于含 5% CO₂, 37 °C 培养箱中培养, 1~2 d 传代 1 次, 选择对数生长期细胞作为研究对象。转染

用 siRNA 及对照 siRNA 购自 Santa 公司, 按说明书进行操作, 扩增培养后 Western blot 检测 HSF-1 (Abcam) 的表达。

1.2 ELISA 检测培养基 TNF- α 含量

时效关系: 将 RAW264.7 细胞接种到 12 孔板内培养 24 h 后, 加入 HMGB1 (Sigma), 1 μ g/mL, 分别于 0、2、4、8、12、16、20、24 h 后停止反应, 收集细胞上清, 按试剂盒 (BioLegend) 说明书检测检测 TNF- α 含量。量效关系: 将 RAW264.7 细胞接种到 12 孔板内培养 24 h 后, 分别加入 HMGB1 10、100、500、1 000 ng/mL, 收集细胞上清, 按试剂盒说明书检测检测 TNF- α 含量。

1.3 免疫荧光检测 NF- κ B 核转移

RAW264.7 细胞爬片 24 h 后, 加入 1 μ g/mL HMGB1 后分别于 0、0.5、1 h 停止反应, 4% 多聚甲醛固定后封闭 1 h, 加入兔抗小鼠 NF- κ B (Abcam), 4 °C 过夜。PBS 清洗 3 次后加入 Cy3 标记的二抗 (Jackson immunoresearch) 后避光孵育 2 h, DAPI 复染核, 甘油封片。避光于荧光显微镜下观察。

1.4 Western blot 检测 HSF-1 含量

RAW264.7 细胞加入 1 μ g/mL HMGB1 或同等剂量的 PBS 后于 4 h 停止反应, 用细胞刮子刮下细胞, 提取蛋白质。BAC 蛋白定量试剂盒 (Wellbio) 测定蛋白总浓度, 每个样本取 50 μ L 蛋白上样, 电泳后 (浓缩胶 80 V, 分离胶 120 V) 电转移至 PVDF 膜 (90 V 低温 2 h), 丽春红检测转膜效果后洗净, 封闭后加入兔抗小鼠 HSF-1 (Abcam) 或 β -action (Proteintech), 4 °C 孵育过夜, TBS-T 清洗 3 次后加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (Proteintech) 孵育 60 min, TBS-T 清洗 3 次。ECL 显色曝光后扫描底片。用 Band Scan 凝胶分析软件对图片进行灰度分析。

1.5 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行 t 检验或单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HMGB1引起TNF- α 表达的时效及量效关系

时效关系: HMGB1作用RAW264.7细胞后第4及第12 h出现两次分泌高峰。1 $\mu\text{g/mL}$ HMGB1作用于RAW264.7细胞0、2、4、8、12、16、20、24 h后TNF- α 在培养基中的含量分别为0、(7234.4 \pm 545.7)、(12342.4 \pm 467.4)、(9678.2 \pm 368.3)、(19568.3 \pm 569.2)、(13248 \pm 456.9)、(5093 \pm 245.8)、

(2456.7 \pm 167.3) pg/mL , 差异有统计学意义 ($F=1342.7, P<0.01$) (图1)。

量效关系: TNF- α 的表达随HMGB1使用量的增加而增加。不同剂量的HMGB1 (0、10、100、500、1 000 ng/mL) 作用于RAW264.7细胞4 h后TNF- α 在培养基中的含量分别是: 0、(1234.3 \pm 123.2)、(3875.4 \pm 234.2)、(7064.2 \pm 329.4)、(13674.7 \pm 424.4) pg/mL , 差异有统计学意义 ($F=1023.3, P<0.01$) (图2)。

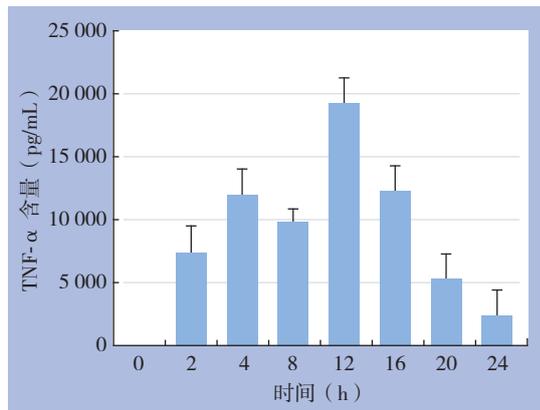


图1 HMGB1诱导TNF- α 表达的时效关系

Figure 1 Time-effect of HMGB1-induced TNF- α expression

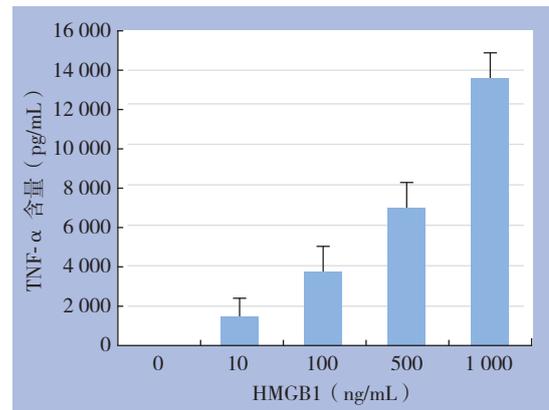


图2 HMGB1诱导TNF- α 表达的量效关系

Figure 2 Concentration-effect of HMGB1-induced TNF- α expression

2.2 HMGB1引起的NF- κ B核转移

HMGB1可以引起RAW264.7细胞NF- κ B核转移, 1 $\mu\text{g/mL}$ HMGB1作用于RAW264.7细胞0 h后NF- κ B位于胞核中的阳性率为(5.2 \pm 0.2)%, 0.5 h后为(32.2 \pm 2.3)%, 1 h后为(89.3 \pm 5.2)% ($F=15.2, P<0.05$) (图3)。

2.3 HMGB1对HSF1表达的影响

HMGB1可以引起RAW264.7细胞HSF-1表达的增加, 如图4所示, 1 $\mu\text{g/mL}$ HMGB1或PBS作用于RAW264.7细胞4 h后, HSF-1/ β -actin的比值分别为0.675 \pm 0.022、0.430 \pm 0.030, 与PBS对照组相比, HMGB1处理后的细胞HSF1表达有所增加 ($t=10.8, P<0.05$)。

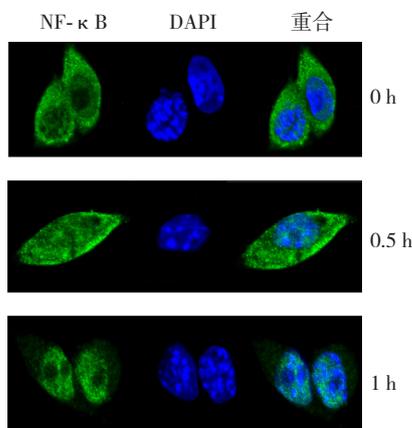


图3 HMGB1引起NF- κ B的核转移

Figure 3 NF- κ B nuclear translocation induced by HMGB1

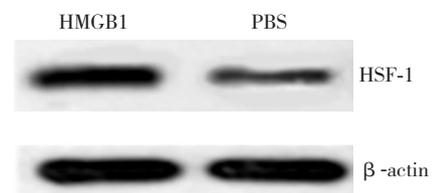


图4 HMGB1上调HSF1的表达

Figure 4 HMGB1-induced up-regulation of HSF1 expression

2.4 沉默HSF1对TNF- α 表达的影响

结果显示, 空白对照组、siRNA对照组, HSF1沉默组, HSF-1/ β -actin的比值为0.592 \pm 0.037、0.573 \pm 0.048、0.265 \pm 0.021, 差异有统计学

意义 ($F=1253.2$, $P<0.05$) (图5); 空白对照组, siRNA对照组, HSF沉默组TNF- α 在培养基中的含量分别为 ($14\ 184.2 \pm 434.4$)、($14\ 470.3 \pm 432.7$)、($19\ 388.5 \pm 557.6$) pg/mL, 其中空白组与siRNA对照组TNF- α 含量无明显差异 ($t=0.29$, $P>0.05$), HSF沉默组TNF- α 含量明显高于siRNA对照组 ($t=15.6$, $P<0.05$) (图6)。

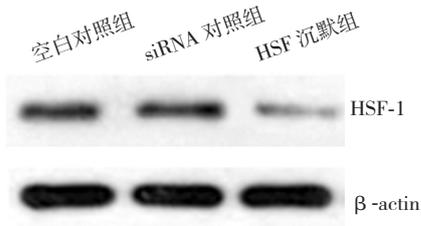


图 5 HSF-1 沉默效果检测

Figure 5 Determination of HSF-1 silencing effect

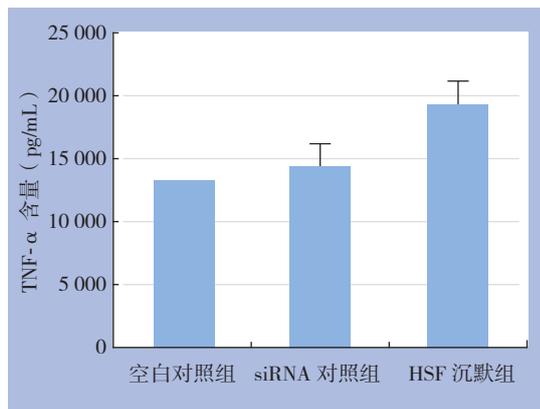


图 6 沉默 HSF-1 上调 TNF- α 的表达

Figure 6 Up-regulation of TNF- α expression after HSF-1 silencing

3 讨论

有研究^[13]表明, 剔除HSF-1基因的小鼠在LPS刺激后会产生更多的TNF- α , 加速不可控炎症反应的发展。胞外HMGB1作用于细胞后, 能通过不同的受体通路影响转录因子NF- κ B的活性, 引起TNF- α , IL-6等炎症因子的分泌, 对炎症反应的发生发展起着重要作用^[14], 本实验表明, HMGB1在通过NF- κ B途径诱导炎症因子TNF- α 表达的同时可以上调HSF-1的表达, 而后者可在一定程度上抑制炎症因子的表达。该结果不仅说明了HSF-1在炎症反应中的抑炎作用, 也为HMGB1在炎症反应中的作用定义了新的角色。

在本实验中, 首先通过HMGB1引起TNF- α 表达的时效及量效关系确定了其最佳时间和剂量, 结果表明, TNF- α 的分泌在HMGB1作用后第4及第12 h存在着两个高峰, 且在24 h内能持续分泌, 说明HMGB1对TNF- α 的作用不同于LPS, 与之前的研究相符^[15]。接下来, 本研究验证了NF- κ B在HMGB1诱导的TNF- α 表达中的作用, 结果表明HMGB1可以诱导NF- κ B发生核转移, 说明NF- κ B途径在HMGB1诱导TNF- α 的表达中起重要作用。在接下来的实验中发现, HMGB1不仅能引起NF- κ B的核转移, 同时也增加了HSF1的表达, 而后者对TNF- α 的抑制作用在随后的试验中得到了证实, 即HSF-1沉默的细胞在HMGB1的诱导下能产生更大剂量的TNF- α 。综上所述, 本研究表明HMGB1不仅能引发促炎因子的表达, 也能通过上调HSF-1的表达来调控炎症反应的不可控发展。

外源性HMGB1作为重要的晚期炎症因子被大家所熟识, 因其具有较长的治疗时间窗, 因此被视为潜在的治疗靶点给予了高度重视^[16]。但近期, 越来越多的学者开始对HMGB1在炎症反应中扮演的角色产生了质疑。首先, 有研究^[17]表明, HMGB1具有与多种因子形成复合物的能力, 并能通过结合不同受体产生不同的效应, 换句话说, HMGB1本身并不具备炎症因子的作用, 其所表现出的促炎作用是通过协同其他因子表现出来的。其次, HMGB1能够促进干细胞的迁移和分化, 该作用与组织的重建有关, 这种与炎症反应相悖的特点一直是学者们研究的焦点^[18]。再次, 近期还有研究^[19]表明HMGB1预处理可以引起内毒素耐受和对肝脏及心肌细胞缺血再灌注损伤的耐受, 而笔者的相关研究也表明HMGB1的存在是建立内毒素耐受所不可或缺的关键因子。在本实验中, HMGB1不仅诱导了NF- κ B的活化, 更意外的上调了HSF-1的表达, 而后者恰恰被证实能在炎症反应中抑制炎症因子的表达。

HSF-1在正常状态下以无活性的单体形式存在胞浆中, 在应激状态下被激活, 移位至胞核, 结合至HSP基因5'端启动子的热休克元件(HSE), 尔后启动各种HSP基因的表达。HSP具有重要的分子伴侣功能, 能介导其他蛋白质的正确装配, 但自己不成为最后功能结构中的组分, 在细胞内源性保护中具有重要作用。热休克反应(HSR)是生物体重要的内源性保护机制, 其激发过程包括HSF-1的激活、HSF-1与HSE结合启动HSP基因表达, HSP作用于组织细胞发挥分子伴侣作用^[20]。在内毒素休克、严重创伤及急性呼吸窘迫综合征患者的中性粒细胞、巨噬细胞或组织

细胞中, HSR被激活, HSP的表达有所增加。除了启动HSP基因的表达, HSF1本身也可以抑制炎症因子的表达, 应用LPS刺激剔除HSF-1基因的小鼠会诱导其产生更大量的炎症因子, 其分子机制目前尚无定论^[21]。在本实验中, HMGB1刺激抑制HSF-1表达的细胞后, TNF- α 的表达明显上升, 提示HSF-1在HMGB1诱导的炎症反应中同样扮演着抑炎的角色, 但其分子机制还有待研究。

综上所述, 本研究表明HMGB1可以引起HSF-1的表达, 而后者可以部分抑制TNF- α 的表达。本实验首次提出了炎症反应中HMGB1与HSF-1之间的关系, 并且证实了HSF-1在HMGB1诱导的全身性炎症反应中的抑炎作用, 本研究结果可为控制急性胰腺炎中的炎症级联反应提供新的思路。

参考文献

- [1] Munsell MA, Buscaglia JM. Acute pancreatitis[J]. *J Hosp Med*, 2010, 5(4):241-250.
- [2] Bai Y, Liu Y, Jia L, et al. Severe acute pancreatitis in China: etiology and mortality in 1976 patients[J]. *Pancreas*, 2007, 35(3):232-237.
- [3] Bumbasirevic V, Radenkovic D, Jankovic Z, et al. Severe acute pancreatitis: overall and early versus late mortality in intensive care units[J]. *Pancreas*, 2009, 38(2):122-125.
- [4] Andersson B, Olin H, Eckerwall G, et al. Severe acute pancreatitis-outcome following a primarily non-surgical regime[J]. *Pancreatol*, 2006, 6(6):536-541.
- [5] 崔传友, 吴全生, 亓玉忠, 等. HMGB-1和TSGF联合检测诊断甲状腺癌的价值[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(5):536-539.
- [5] Cui CY, Wu QS, Qi YZ, et al. Clinical value of combination detection of HMGB-1 and TSGF for diagnosis of thyroid cancer[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2012, 21(5):536-539.
- [6] Anckar J, Sistonen L. Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 594:78-88.
- [7] Xiao X, Zuo X, Davis AA, et al. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice[J]. *EMBO J*, 1999, 18(21):5943-5952.
- [8] Schierbeck H, Wähämaa H, Andersson U, et al. Immunomodulatory drugs regulate HMGB1 release from activated human monocytes[J]. *Mol Med*, 2010, 16(9/10):343-351.
- [9] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice[J]. *Science*, 1999, 285(5425):248-251.
- [10] Palumbo R, Bianchi ME. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment[J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(6):1165-1170.
- [11] Robert SM, Sjodin H, Fink MP, et al. Preconditioning with high mobility group box 1 (HMGB1) induces lipoteichoic acid (LTA) tolerance[J]. *J Immunother*, 2010, 33(7):663-671.
- [12] Hu X, Jiang H, Cui B, et al. Preconditioning with high mobility group box 1 protein protects against myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Int J Cardiol*, 2010, 145(1):111-112.
- [13] Andersson U, Wang H, Palmblad K, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(4):565-570.
- [14] Bianchi ME. HMGB1 loves company[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(3):573-576.
- [15] Takii R, Inouye S, Fujimoto M, et al. Heat shock transcription factor 1 inhibits expression of IL-6 through activating transcription factor 3[J]. *J Immunol*, 2010, 184(2):1041-1048.
- [16] Silver JT, Noble EG. Regulation of survival gene hsp70[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2012, 17(1):1-9.
- [17] Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, et al. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer[J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28:367-388. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132603.
- [18] Zhang Z, Zhang L, Zhou C, et al. Ketamine inhibits LPS-induced HMGB1 release in vitro and in vivo[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(1):14-26.
- [19] Yang Y, Wang J, Yang Q, et al. Shikonin inhibits the lipopolysaccharide-induced release of HMGB1 in RAW264.7 cells via IFN and NF- κ B signaling pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 19(1):81-87.
- [20] 谷惠茹, 栾斌, 乔俊英, 等. 1, 25-(OH)2D3对哮喘小鼠肺内高迁移率族蛋白B1及Toll样受体4表达的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2014, 16(3):301-305.
- [20] Gu HR, Luan B, Qiao JY, et al. Effect of 1, 25-(OH) 2D3 on expression of HMGB1 and TLR4 in the lungs of asthmatic mice[J]. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 2014, 16(3):301-305.
- [21] Doi K, Ishizu T, Tsukamoto-Sumida M, et al. The high-mobility group protein B1-Toll-like receptor 4 pathway contributes to the acute lung injury induced by bilateral nephrectomy[J]. *Kidney Int*, 2014, 86(2):316-326.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 尹朝奇, 贺全勇, 罗成群, 等. HSF-1在HMGB1诱导的炎症反应中的作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(9):1291-1295. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.09.011

Cite this article as: Yin CQ, He QY, Luo CQ, et al. Role of HSF-1 in inflammatory response induced by HMGB1[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(9):1291-1295. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.09.011