

SIRT1抑制细菌脂多糖耐受THP-1细胞中IL-1 β mRNA的转录

陈小萍 李明慧 从美丽 康雁君 郭文平 张永振

【摘要】 目的 研究细菌脂多糖(LPS)耐受的THP-1细胞中沉默信息调节因子1(SIRT1)对IL-1 β 转录的调节作用。方法 使用LPS耐受的人单核细胞THP-1模型,染色体免疫沉淀和real-time PCR定量研究IL-1 β 启动子区SIRT1结合情况和组蛋白H3 lys9/H4 lys16的乙酰化情况。结果 在LPS耐受的THP-1细胞中,SIRT1对IL-1 β 启动子区的结合增加约5倍左右($P < 0.05$),同时伴随着组蛋白H3 lys9/H4 lys16乙酰化的低水平状态(与正常细胞相比 $P < 0.05$)。SIRT1沉默使IL-1 β 的转录恢复到正常细胞的68%($P < 0.05$),同时伴随着组蛋白H3 lys9/H4 lys16乙酰化的增加($P < 0.05$)。然而,正常细胞和耐受细胞p65 lys310乙酰化水平无明显差异。结论 SIRT1抑制LPS耐受的THP-1细胞中IL-1 β mRNA的转录,其作用与p65 lys310乙酰化无关,但是与IL-1 β 启动子区乙酰化有关。

【关键词】 沉默信息调节因子1; IL-1 β 启动子; 组蛋白乙酰化

SIRT1 inhibits IL-1 β mRNA transcription in lipopolysaccharide tolerant THP-1 cells CHEN Xiao-ping, LI Ming-hui, CONG Mei-li, KANG Yan-jun, GUO Wen-ping, ZHANG Yong-zhen. State Key Laboratory for Infectious Disease Control and Prevention, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Corresponding author: ZHANG Yong-zhen, Email: yongzhenzhang@sohu.com

【Abstract】 **Objective** To explore the role of silent information regulation 2 homolog 1 (SIRT1) in the regulation of IL-1 β mRNA transcription in lipopolysaccharide(LPS) tolerant THP-1 cells. **Methods** THP-1 human promonocyte model of endotoxin tolerance that simulates the sepsis leukocyte phenotype was used. Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) and real-time PCR were applied to quantify the binding of SIRT1 and histone H3 lys9/H4 lys16 acetylation to IL-1 β promoter. IL-1 β mRNA transcription was studied after knocking down the SIRT1. **Results** The binding of SIRT1 to IL-1 β promoter increased about 5 times in tolerant THP-1 cells ($P < 0.05$), which was accompanied by the low level of histone H3 lys9/H4 lys16 acetylation ($P < 0.05$, compared with normal cells). Knocking-down of SIRT1 increased the transcription of IL-1 β mRNA up to the level of 68% of normal cells ($P < 0.05$), which was accompanied by the increase of histone H3 lys9/H4 lys16 acetylation ($P < 0.05$). However, there was no significant difference of p65 lys310 acetylation between normal and tolerant cells. **Conclusion** SIRT1 inhibited the IL-1 β mRNA transcription in tolerant THP-1 cells but had not related to p65 lys310 acetylation. However, it was related to IL-1 β promoter acetylation.

【Key words】 Silent information regulation 2 homolog 1; IL-1 β promoter; Histone acetylation

细菌脂多糖(LPS)长时间刺激THP-1细胞可导致炎症因子表达下调,这种免疫抑制状态被称为LPS耐受^[1]。调节免疫和炎症反应的NF- κ B转录因子家族最常见的是由p65(ReIa)和p50构成的具有激活基因表达作用的二聚体。p65 lys310乙酰化后活性增加,结合于目标基因启动子区的NF- κ B转录

因子结合区,激活包括各种炎症基因的表达^[2]。而沉默信息调节因子1(SIRT1)对p65的去乙酰化作用则能抑制NF- κ B依赖的基因转录^[3]。在LPS耐受的THP-1细胞中,SIRT1是否也起到了抑制炎症基因转录的作用,是否也是通过对p65的去乙酰化实现的还不清楚。本研究则通过对LPS耐受的THP-1细胞进行研究以揭示这一问题。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.06.018

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室

通信作者:张永振, Email: yongzhenzhang@sohu.com

材料与方法

1. 试剂来源:革兰阴性菌LPS(*Escherichia coli*)

O111:B4) 购自美国 Sigma 公司; SIRT1-Ab、Ac-H3 lys9-Ab 和 Ac-H4 lys16-Ab, 对照 siRNA (非特异 siRNA) 和 SIRT1 siRNA 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; ChIP 试剂盒购自美国 Upstate Biotechnology 公司; Primer Express R 1.0 软件、鼠白血病反转录酶、IL-1 β 和 GAPDH predesigned TaqMan primer/probe 试剂盒购自美国 ABI 公司; RNA STAT-60 购自美国 Friendswood 公司; Nucleofector 购自美国 Gaithersburg 公司。

2. 细胞培养和 LPS 耐受的建立: 人原核细胞 THP-1 购自美国标准物培养库 (ATCC)。培养液 (添加了 10% 胎牛血清的 RPMI 1640) 中添加 1 μ g/ml *Escherichia coli* O111:B4 培养 16 h 造成 LPS 耐受^[4]。每次实验前, LPS 耐受细胞 (T) 和 LPS 反应正常细胞 (N) 均用少量培养液洗涤, 调整至 1×10^6 cell/ml, 并用 1 μ g/ml 的 LPS 刺激相应的时间。

3. Western blotting: 收集 1.5×10^6 个细胞用 PBS 洗 2 次, 细胞重新悬浮于 100 μ l 的 RIPA1 缓冲液 [含 0.45% NaCl, 0.5% deoxycholate, 0.5% Triton X-100, 0.05% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.005 mol/L Tris], 冰上孵育 20 min, 此为细胞总蛋白。收集 5×10^6 个细胞重悬于 50 μ l 缓冲液 A (10 mmol/L HEPES, 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L KCl, 0.25 mmol/L EDTA) 中冰上孵育 15 min, 加入 1 ml 缓冲液 B (10 μ l Sigma 100 \times inhibitor cocktail, 20 μ l 1 mol/L NaF, 2 μ l 0.5 mol/L Na₂P₂O₇, 1 μ l 1 mol/L DTT) 及 0.8 μ l 25% 的 Triton X-100。涡旋 10 s 后离心 (10 000 r/min, 5 min), 上清为细胞质蛋白提取液。沉淀重新悬浮于 100 μ l RIPA2 (1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS in PBS), 离心后取上清为细胞核蛋白提取液。20 mg 全细胞蛋白提取液或 30 mg 核蛋白、细胞质蛋白用 SDS-PAGE 分离并转膜, SIRT1-Ab 检测转膜后蛋白中 SIRT1 的量并进行 X 线曝光分析。

4. 染色体免疫沉淀 (ChIP) 分析: 为了定量分析 SIRT1 和 H3 lys9/H4 lys16 乙酰化在 IL-1 β 启动子区的结合情况, 根据 ChIP 试剂盒说明书进行。溶液中添加 1% 甲醛室温孵育 10 min 固定细胞, 加入裂解缓冲液后, 超声破碎产生 0.5 ~ 1 kb 的染色体片段。每个样品分成两份, 其中一份作为免疫沉淀前的对照, 不与特异性抗体反应, 另一份分别加入特异抗体 (Ab-SIRT1, Ac-H3 lys9 和 Ac-H4 lys16 抗体), 然后置 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜。非特异性 IgG 抗体作为阴性对照。通过酚氯仿抽提和乙醇沉淀, 最后用 20 μ l 双蒸水溶解沉淀的 DNA。

5. ChIP DNA real-time PCR 分析: 用 real-time PCR 对免疫沉淀的 DNA 进行定量分析。用 Primer Express R 1.0 软件设计 IL-1 β 启动子区引物: FP: 5'-CGT GGG AAA ATC CAG TAT TTT AAT G-3' 和 RP: 5'-CAA ATG TAT CAC CAT GCA AAT ATG C-3', 荧光探针为 5'-6-FAM-ACA TCA ACT GCA CAA CGA TTG TCA GGA AAA-TAMRA-3'。使用 ABI Prism 7000 荧光定量 PCR 仪持续检测 40 个循环中的 PCR 荧光产物。所得的结果用免疫沉淀前的 DNA 对照进行校正, 用与正常细胞 LPS 刺激前 (0 h) 的值相比改变的倍数表示。

6. mRNA 提取、反转录和 real-time PCR 分析: 根据试剂盒说明书, 用 RNA STAT-60 提取细胞总 RNA。取 2 mg RNA 加入 25 μ l 体系进行反转录, 包括 0.2 μ mol/L dNTPs, 2.5 μ mol/L oligo d(T), 5 mmol/L MgCl₂ 和 0.25 U/ μ l 鼠白血病反转录酶。real-time PCR 反应包括 5 μ l cDNA 和 IL-1 β 或 GAPDH predesigned TaqMan primer/probe sets (美国 ABI 公司)。PCR 反应条件同上, 样品结果用 GAPDH 值校正, 用与正常细胞 LPS 刺激前 (0 h) 的值相比改变的倍数表示。

7. RNA 干扰: 收集指数生长期细胞, 用 PBS 洗涤。取对照 siRNA、SIRT1 siRNA 5 μ l (0.5 μ mol/L) 于 100 μ l Nucleofector 进行电转染后, LPS 耐受组加入 1 μ g/ml LPS。24 h 后收集细胞, 用少量培养液洗涤, LPS 刺激至相应时间。

8. 统计学分析: 用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 3 次独立的实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, Student *t* 检验计算组间 *P* 值。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. SIRT1 对耐受细胞中 IL-1 β 转录的影响: LPS 耐受细胞核存在丰富的 SIRT1 蛋白, SIRT1 沉默的耐受细胞 IL-1 β 转录恢复至一定水平。正常细胞随着 LPS 刺激, 细胞核中的 SIRT1 逐渐减少, 而细胞质中的 SIRT1 逐渐增加, 总量基本保持不变。而在 LPS 耐受细胞中, 细胞核和细胞质中的 SIRT1 均保持不变, 且以细胞核中存在大量恒定的 SIRT1 为主要特点 (图 1)。为了研究 SIRT1 在耐受细胞中对 IL-1 β 转录的影响, 对耐受细胞中的 SIRT1 基因进行沉默后, Western blot 显示耐受细胞中 SIRT1 沉默导致细胞内 SIRT1 蛋白含量降低 (图 2A)。正常细胞随着 LPS 刺激, IL-1 β mRNA 逐渐升高, 在 1 h 左右达到高峰, 随后降低, 约 3 h 还高于 LPS 刺激前水平; 在耐

受细胞(T+对照 siRNA)中,LPS 刺激并没有引起 IL-1 β 转录的高峰反应,在刺激后的 0.5、1、3 h, IL-1 β 转录水平未出现显著增高(在 3 个时间点差异均有统计学意义, $P < 0.05$),符合 LPS 耐受的特点;而 SIRT1 沉默的耐受细胞(T+SIRT1 siRNA)在 LPS 刺激下,IL-1 β 转录又出现明显上升的趋势,在 1 h 左右达到高峰(约达到正常细胞的 68%),虽然并没有完全恢复到正常水平,但是与耐受细胞相比,差异有统计学意义(图 2B)。

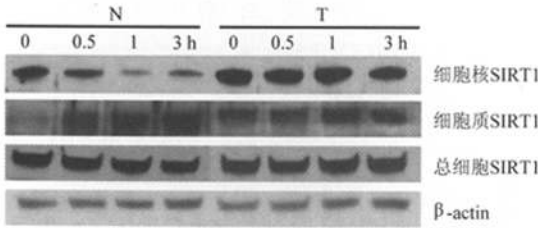
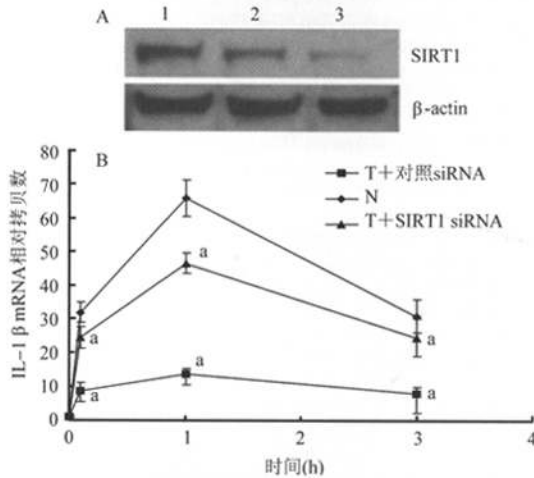


图1 LPS N和T细胞中SIRT1在LPS刺激下不同时间点的表达

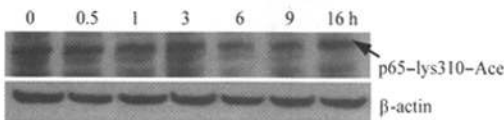


注: A: Western blot 结果; B: real-time PCR 结果; 1: T+对照 siRNA; 2: N; 3: T+SIRT1 siRNA; * $P < 0.05$

图2 SIRT1 沉默对 LPS T 细胞 IL-1 β 转录的影响

2. SIRT1 对 IL-1 β 转录的抑制作用:

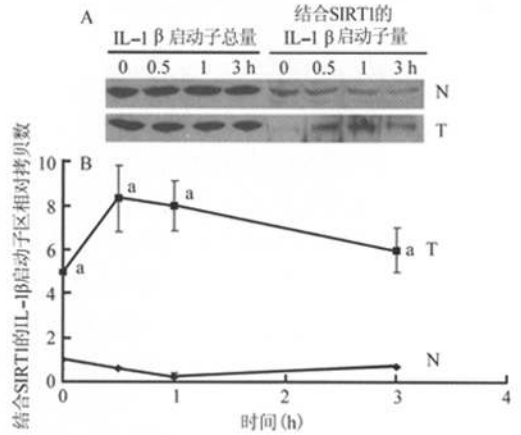
(1) LPS 刺激对 THP-1 细胞中 p65-lys310-Ace 表达的影响: THP-1 细胞用 LPS 刺激 16 h 造成细胞耐受后并未引起 p65-lys310-Ace 的明显改变(图 3)。



注: 刺激 16 h 已经造成 LPS 耐受

图3 THP-1 细胞在 LPS 刺激不同时间后对细胞内 p65-lys310-Ace 表达调节的作用

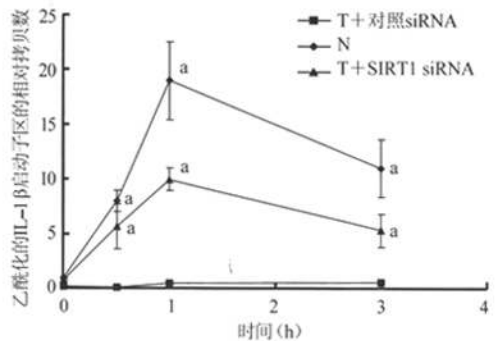
(2) LPS 刺激对 SIRT1 与 IL-1 β 启动子区结合的影响: 在正常细胞中, 随着 LPS 刺激, SIRT1 对 IL-1 β 启动子区结合逐渐降低, 约在 1 h 左右达到低谷, 随后又逐渐上升。而在耐受细胞中, SIRT1 持续地结合于 IL-1 β 启动子区, 在无 LPS 刺激时, 在耐受细胞中的结合量是正常细胞的 5 倍左右, 随着 LPS 刺激结合增加, 结合的量显著高于正常细胞(在 3 个时间点的差异均有统计学意义, $P < 0.05$), 见图 4。



注: A: 常规 PCR 结果; B: real-time PCR 结果; * $P < 0.05$;

图4 LPS N和T细胞中SIRT1在LPS刺激下与IL-1 β 启动子区结合情况

(3) SIRT1 沉默对耐受细胞中 IL-1 β 启动子区 H3 lys9 和/或 H4 lys16 乙酰化的影响: 正常细胞中, 随着 LPS 刺激, IL-1 β 启动子区 H3 lys9 和/或 H4 lys16 乙酰化逐渐增加, 在 1 h 左右达到高峰, 随后逐渐降低; 而在耐受细胞(T+对照 siRNA)中, IL-1 β 启动子区 H3 lys9 和/或 H4 lys16 乙酰化始终保持在非常低的状态, 并不随着 LPS 刺激而改变; 而 SIRT1 (T+SIRT1) 沉默后, 随着 LPS 刺激, IL-1 β 启动子区乙酰化又再次升高, 虽然峰值并未达到正常细胞水平(图 5)。



注: * $P < 0.05$

图5 SIRT1 沉默对 T 细胞 IL-1 β 启动子区乙酰化的影响

讨 论

SIRT1 是哺乳动物中氨基酸序列最接近酵母基因沉默信息调节因子2(Sir2)的同源蛋白,具有强大的依赖NAD⁺的脱乙酰基酶活性,其对诸多底物如p53、FOXO、Ku70、NF-κB、PGC-1α、TAFI68、p300、PCAF等均具有强大的去乙酰化作用,可能参与细胞凋亡、细胞周期调控、基因转录、物质代谢和一些其他细胞调节通路^[5-8]。SIRT1对炎症因子转录水平的调控研究较少,SIRT1的减少被认为是某些疾病中TNFα转录增加的原因^[9]。以LPS刺激巨噬细胞发现SIRT1转录、翻译和蛋白活性均降低,而抑制或沉默SIRT1则导致TNFα产生增加,说明SIRT1抑制巨噬细胞中TNFα的生成^[10]。本研究结果显示,随着LPS刺激,正常THP-1细胞总的SIRT1蛋白量并未改变,细胞核中的SIRT1减少,逐渐向细胞质转移,同时IL-1β转录增加提示SIRT1从细胞核转移到细胞质中,而解除了对IL-1β转录的抑制作用。而在LPS耐受的THP-1细胞中,细胞质中的SIRT1蛋白可能是LPS造成耐受之前从细胞核转移到细胞质中的;耐受细胞核存在大量恒定的SIRT1蛋白,似乎表明耐受细胞核中的SIRT1蛋白起到抑制IL-1β转录的作用,这种作用有可能与IL-1β基因启动子区有关。进一步沉默耐受细胞的SIRT1导致耐受细胞IL-1β转录部分恢复,进一步说明,耐受细胞中SIRT1抑制IL-1β mRNA的转录。

CBP/p300催化的NF-κB p65 lys310乙酰化与其细胞核内转移,并结合到IL-1β基因启动子区,激活基因转录活性有密切关系^[11,12]。SIRT1可以导致p65 lys310去乙酰化从而抑制其向细胞核转移,降低NF-κB p65的转录活性^[13]。而在LPS耐受的THP-1细胞中,p65能像正常细胞一样从细胞质向胞核转移,然而不能结合到炎症因子启动子区^[14]。而且在本研究中,并未发现耐受细胞和正常细胞p65 lys310乙酰化程度有明显差异,说明LPS耐受的THP-1细胞中,p65不能结合到IL-1β启动子区并不是由于lys310去乙酰化造成的。研究表明,SIRT1还可以对组蛋白去乙酰化,通过对H1 lys26、H3 lys9和H4 lys16去乙酰化而降低基因转录活性^[15]。由于本研究并未确定具体发生去乙酰化作用的位点,所以使用了H3 lys9和H4 lys16的混合抗体进行ChIP分析。对IL-1β启动子区研究发现,LPS耐受THP-1细胞中H3 lys9和/或H4 lys16乙酰化降低,正常细胞中随着LPS刺激乙酰化逐渐增加。SIRT1沉默后,

H3 lys9和/或H4 lys16乙酰化部分恢复到正常细胞水平,说明耐受细胞中SIRT1抑制H3和/或H4乙酰化,从而导致染色体的紧密结构和基因转录活性的降低^[16,17]。SIRT1是否导致p65其他位点乙酰化改变,或者影响其他组蛋白位点的乙酰化状态还有待进一步研究。

综上所述,SIRT1通过对H3 lys9和/或H4 lys16去乙酰化,抑制了LPS耐受的THP-1细胞中IL-1β转录。

参 考 文 献

- [1] Yoza BK, McCall CE. Facultative heterochromatin formation at the IL-1 beta promoter in LPS tolerance and sepsis. *Cytokine*, 2011, 53(2): 145-152.
- [2] Choi KC, Jung MG, Lee YH, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a histone acetyltransferase inhibitor, inhibits EBV-induced B lymphocyte transformation via suppression of RelA acetylation. *Cancer Res*, 2009, 69(2): 583-592.
- [3] Salminen A, Kauppinen A, Suuronen T, et al. SIRT1 longevity factor suppresses NF-kappaB-driven immune responses: regulation of aging via NF-kappaB acetylation? *Bioessays*, 2008, 30(10): 939-942.
- [4] LaRue KE, McCall CE. A labile transcriptional repressor modulates endotoxin tolerance. *J Exp Med*, 1994, 180(6): 2269-2275.
- [5] Dittenhafer-Reed KE, Feldman JL, Denu JM. Catalysis and mechanistic insights into sirtuin activation. *ChemBiochem*, 2011, 12(2): 281-289.
- [6] Saunders LR, Verdin E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*, 2007, 26(37): 5489-5504.
- [7] Lavu S, Boss O, Elliott PJ, et al. Sirtuins-novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(10): 841-853.
- [8] Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins—emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev*, 2006, 20(21): 2913-2921.
- [9] Rajendrasozhan S, Yang SR, Kinnula VL, et al. SIRT1, an antiinflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(8): 861-870.
- [10] Shen Z, Ajmo JM, Rogers CQ, et al. Role of SIRT1 in regulation of LPS- or two ethanol metabolites-induced TNF-alpha production in cultured macrophage cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296(5): 1047-1053.
- [11] Ito K. Impact of post-translational modifications of proteins on the inflammatory process. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(2): 281-283.
- [12] Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, et al. SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *J Biol Chem*, 2005, 280(48): 40364-40374.
- [13] Kubota S, Kurihara T, Mochimaru H, et al. Prevention of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis with resveratrol by inhibiting oxidative damage and nuclear factor-kappaB activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(7): 3512-3519.
- [14] Chan C, Li L, McCall CE, et al. Endotoxin tolerance disrupts chromatin remodeling and NF-kappaB transactivation at the IL-1 beta promoter. *J Immunol*, 2005, 175(1): 461-468.
- [15] Deng CX. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? *Int J Biol Sci*, 2009, 5(2): 147-152.
- [16] Senawong T, Peterson VJ, Leid M. BCL11A-dependent recruitment of SIRT1 to a promoter template in mammalian cells results in histone deacetylation and transcriptional repression. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 434(2): 316-325.
- [17] Allahverdi A, Yang R, Korolev N, et al. The effects of histone H4 tail acetylations on cation-induced chromatin folding and self-association. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(5): 1680-1691.

(收稿日期: 2011-01-28)

(本文编辑: 王玉立)