

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01356

• 研究快报 •

低氧对大鼠大脑皮质细胞分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的影响

李华华, 娄淑杰*

上海体育学院运动科学学院运动生化与营养学教研室, 上海体育学院运动健身科技教育部重点实验室, 上海 200438

[摘要] **目的** 观察低氧环境对大鼠大脑皮质细胞分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的影响。**方法** 原代培养新生 SD 大鼠大脑皮质细胞, 设 1%、4% 两个低氧浓度和 3 h、6 h 两个低氧处理时间, 处理结束后采用 ELISA 方法检测各组细胞培养液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量。**结果** 与相应的常氧(20%氧)对照组相比, 1%氧浓度环境处理细胞 3 h 和 6 h, IL-6 含量均下降($P < 0.01$, $P < 0.05$), IL-1 β 和 TNF- α 含量变化无统计学意义($P > 0.05$)。与相应的常氧(20%氧)对照组相比, 4%氧浓度环境处理细胞 3 h, IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量变化均无统计学意义($P > 0.05$); 处理细胞 6 h 时, IL-1 β ($P < 0.01$) 和 IL-6 ($P < 0.05$) 均显著下降, TNF- α 含量变化无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 1%氧浓度环境虽对大脑皮质细胞分泌 IL-1 β 和 TNF- α 无影响, 但可抑制细胞分泌 IL-6。4%氧浓度环境虽对细胞分泌 TNF- α 无影响, 但对细胞分泌 IL-1 β 和 IL-6 具有抑制作用。

[关键词] 细胞低氧; 大脑皮质; 白介素 1 β ; 白介素 6; 肿瘤坏死因子 α

[中图分类号] R 741.02 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)12-1356-04

Effects of hypoxia on secretion of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in cerebral cortex cells of rats

LI Hua-hua, LOU Shu-jie*

Department of Exercise Biochemistry and Nutrition, School of Kinesiology, Key Laboratory of Exercise and Health Sciences of Ministry of Education, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of different hypoxia treatments on secretion of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the cerebral cortex cells of rats. **Methods** Primary cultured cerebral cortex cells were subjected to hypoxia treatments (1% and 4% oxygen) for 3 h or 6 h. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α protein in cultural supernatants. **Results** (1) Compared with the corresponding normoxia (20% oxygen) controls, IL-6 level was significantly decreased after treatment with 1% oxygen for 3 h and 6 h ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the levels of IL-1 β and TNF- α were not significantly different. (2) Compared with the corresponding normoxia (20% oxygen) controls, the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were not significantly different in cells treated with 4% oxygen for 3 h ($P > 0.05$); the levels of IL-1 β and IL-6 were significantly decreased in cells treated with 4% oxygen for 6 h ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and TNF- α level was not significantly different ($P > 0.05$). **Conclusion** Oxygen at 1% has no influence on IL-1 β or TNF- α secretion in cerebral cortex cells of rats, and it can inhibit the production of IL-6. Oxygen at 4% has inhibitory effect on IL-1 β and IL-6 production, and it has no effect on TNF- α production.

[Key words] cell hypoxia; cerebral cortex; interleukin-1beta; interleukin-6; tumor necrosis factor-alpha

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(12):1356-1359]

中枢神经系统对氧的需求量较大, 而且对缺氧较为敏感, 因而低氧更容易使中枢神经系统受到损害^[1]。低氧造成中枢神经系统损伤是多种因素共同作用的结果, 低氧除了可导致大脑的能量供应不足外, 还可诱使细胞内、外环境发生改变, 如细胞内钙

离子偏高^[2-5], 谷氨酸、天冬氨酸等兴奋性氨基酸释放增加和堆积^[6]。炎症是脑缺氧病理生理过程中一个重要的环节, 在缺氧/缺血性脑损伤中发挥着重要的作用^[7], 且有研究把神经损伤归因于炎症因子, 如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等^[8]。目前有关低氧对炎症因子表达影响的研究主要集中于间歇性低氧、低氧预

[收稿日期] 2012-09-11 **[接受日期]** 2012-10-25

[基金项目] 国家自然科学基金(30870349). Supported by National Natural Science Foundation of China (30870349).

[作者简介] 李华华, 硕士生. E-mail: lihuhua87@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-51253243, E-mail: shujielou319@yahoo.com.cn

适应、缺血性低氧和低氧后再复氧方面,而有关单纯一次性低氧处理对大脑皮质细胞表达炎症因子的研究甚少。鉴于此,本研究设定了重度(1%)、中度(4%)两个低氧浓度和 3 h、6 h 两个低氧处理时间,观察不同氧浓度环境及不同时间处理后大鼠大脑皮质细胞分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的情况,探讨低氧对大鼠大脑皮质细胞分泌炎症因子的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物 新生 24 h 内的 SD 大鼠 18 只,由第二军医大学实验动物中心提供。

1.2 实验试剂 B-27 添加剂(Basis-27 supplement)和 Neurobasal 培养基(Gibco 公司), IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α ELISA 检测试剂盒(eBioscience 公司),多聚赖氨酸和胰蛋白酶(Sigma 公司),胎牛血清和马血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),青霉素-链霉素溶液(碧云天生物技术公司),D-Hanks 液(上海生工生物工程技术有限公司),磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS; 武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 大鼠大脑皮质细胞的分离与培养 取新生 24 h 内 SD 大鼠,无菌条件下分离出双侧大脑皮质,经剪碎、消化、过滤、离心环节后,加入适量的含有 2% B-27 和 1% 青霉素-链霉素的 Neurobasal 培养基,调整细胞密度为 $(6.5 \sim 7.0) \times 10^5$ 个/ml,接种于被多聚赖氨酸包被过的 48 孔细胞培养板中,置于细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 、95% 空气)中培养,在第 3 天半

量换液,第 5 天全量换液。

1.4 锥虫蓝染色 取 20 μ l 锥虫蓝染液于离心管中,再加入等量的细胞悬液,混匀,静置约 2 min,通过细胞计数板于显微镜下观察,计算细胞成活率。

1.5 低氧处理大鼠皮质细胞 低氧处理在低氧工作站(In vivo 2 200 型,英国 Don Whitley Scientific 公司)中进行。将培养 5 d 的低氧组细胞转移至低氧工作站,在 1% 和 4% 氧浓度环境下分别处理 3 h(H3) 和 6 h(H6),其相应的常氧(20%)对照组细胞(C3 和 C6)则继续放置细胞培养箱中。处理结束后,即刻收集细胞培养液,每个实验独立重复 3 次。

1.6 ELISA 法检测 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的蛋白表达 具体操作步骤按照试剂盒操作说明书进行。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

如表 1 所示,1% 氧浓度环境下,与相应的常氧对照组相比, H3 组和 H6 组细胞培养液中 IL-1 β 和 TNF- α 水平变化无统计学意义($P > 0.05$), H3 组细胞培养液中 IL-6 ($P < 0.01$) 和 H6 组中 IL-6 ($P < 0.05$) 水平下降。4% 氧浓度环境下,与 C3 组相比, H3 组细胞培养液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平变化均无统计学意义($P > 0.05$); 与 C6 组相比, H6 组细胞培养液中 IL-1 β ($P < 0.01$) 和 IL-6 ($P < 0.05$) 水平降低,但 TNF- α 水平变化无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 低氧对大鼠大脑皮质细胞分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的影响

Tab 1 Effects of hypoxia on secretion of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in cerebral cortex cells of rats

Group	1% Oxygen			4% Oxygen		
	IL-1 β	IL-6	TNF- α	IL-1 β	IL-6	TNF- α
C3	31.07 \pm 2.42	176.17 \pm 3.40	108.77 \pm 14.18	65.11 \pm 4.87	322.50 \pm 11.76	113.23 \pm 9.34
H3	27.75 \pm 1.85	155.68 \pm 1.96**	111.00 \pm 6.32	59.90 \pm 11.37	312.72 \pm 11.06	107.92 \pm 11.83
C6	30.06 \pm 1.73	166.49 \pm 4.76	113.88 \pm 13.19	73.93 \pm 2.15	303.56 \pm 7.59	113.46 \pm 7.54
H6	29.16 \pm 1.17	155.34 \pm 3.69 Δ	128.40 \pm 27.83	49.48 \pm 1.90 $\Delta\Delta$	281.16 \pm 3.41 Δ	105.09 \pm 18.04

C3: Cerebral cortex cells were subjected to normoxia (20% oxygen) for 3 h; H3: Cerebral cortex cells were subjected to hypoxia (1% or 4% oxygen) for 3 h; C6: Cerebral cortex cells were subjected to normoxia (20% oxygen) for 6 h; H6: Cerebral cortex cells were subjected to hypoxia (1% or 4% oxygen) for 6 h. ** $P < 0.01$ vs C3 group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs C6 group

3 讨论

IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 是重要的炎症介质,在中枢神经系统中主要由神经元、小胶质细胞和星形胶

质细胞分泌。正常生理条件下, IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 对机体的生长发育和内环境的稳定等具有重要作用;在病理状态下,它们异常表达并诱使各种炎症因子瀑布式释放,导致炎症反应的发生,加重组织

细胞损伤。IL-1 β 是炎症应答过程中重要的调节因子之一,脑缺血时IL-1 β 与其他分子相互作用间接性地加重缺氧性脑损伤^[8],如通过基质金属蛋白酶加重脑损伤^[9]。IL-6是一种多效性细胞因子,具有神经保护和神经毒性双重作用。当机体发生缺血/缺氧性脑损伤时,它以直接或间接方式产生神经保护作用^[8,10]。IL-6具有的神经保护功能还表现在它可刺激星形胶质细胞分泌神经生长因子(NGF),且自身具有NGF样作用,有利于神经损伤后的修复^[11]。但有研究显示IL-6对神经细胞具有伤害性,可加重脑组织损伤^[12]。因此,IL-6在脑损伤中发挥保护作用还是神经毒性作用,可能与其在脑内的水平有一定关系。TNF- α 是一种促炎因子,可通过增加一氧化氮的毒性^[13]、促进N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体激活及钙超载损伤的级联反应^[14]、诱导合成急性反应期蛋白^[15]等加重炎症性脑损伤,但在低浓度时TNF- α 同样具有神经保护作用^[16]。

低氧是一种应激原,有关低氧对炎症因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 表达影响的研究涉及到多种细胞类型,但反应有所不同。本研究中我们设定了重度(1%)和轻度(4%)两个低氧状态,观察不同低氧状态对大脑皮质细胞分泌炎症因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的影响。结果表明,1%氧浓度环境下,缺氧3h和6h都可抑制大脑皮质细胞分泌IL-6,但对细胞分泌IL-1 β 和TNF- α 均无影响;4%氧浓度环境下,缺氧3h对大脑皮质细胞分泌IL-1 β 、IL-6和TNF- α 均无影响,缺氧6h虽对细胞分泌TNF- α 仍无影响,但可抑制细胞分泌IL-1 β 和IL-6到细胞外液,说明6h内无论是重度还是轻度低氧对大脑皮质细胞分泌IL-1 β 和IL-6的影响总体呈现抑制作用,此与他人的研究结果有相似之处但又有所不同。Deng等^[17]研究发现3%氧浓度处理小胶质细胞2h可促进细胞分泌IL-1 β ,一直持续到4h,但处理细胞6h时IL-1 β 分泌量开始降低。Di Loreto等^[8]发现中度低氧(氧分压20 mmHg, 1 mmHg = 0.133 kPa)处理神经元6h可抑制神经元分泌IL-6, Fitzgerald等^[18]发现0.5%氧浓度处理近端肾小管上皮细胞15 min即可抑制细胞分泌IL-6,这提示中度和重度低氧可抑制细胞分泌IL-6。Di Loreto等^[19]发现中度低氧(氧分压20 mmHg)处理神经元6h,并未对神经元分泌TNF- α 产生影响;Ha等^[20]发现1%氧浓度处理滑膜细胞24h时也未对细胞分泌

TNF- α 产生影响。但也有研究显示一定程度的低氧可促进细胞分泌IL-1 β 、IL-6和TNF- α 。Li等^[21-22]发现5%和3%氧浓度分别处理小胶质细胞4h和3h时均可促进细胞分泌IL-1 β 和TNF- α , Kaur等^[23]也发现3%氧浓度处理小胶质细胞3h可促进细胞分泌IL-1 β 和TNF- α 。Jeong等^[24]通过去铁敏模拟低氧环境,发现低氧能够促进HEI-OCI细胞分泌IL-6。综上所述,低氧对细胞分泌炎症因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的影响可能会因细胞类型、低氧浓度和低氧处理时间不同而有所不同,具体的机制和生物学意义还有待进一步研究确定。

本研究中,低氧对大脑皮质细胞分泌IL-1 β 和IL-6的抑制作用可能是大脑皮质细胞对缺氧的一种适应性反应,通过抑制炎症因子的分泌来避免因其高水平表达对神经元产生毒性作用,这可能是低氧或缺血预适应的机制之一,提示临床上针对单纯性缺氧或缺血性缺氧的处理及用药,应充分考虑到时间因素。目前关于低氧对炎症因子表达的影响机制涉及活性氧(ROS)、低氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)、NF- κ B、蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和急性反应期蛋白等,但有必要进行更深入的研究,以期阐明缺氧性脑损伤与炎症因子的关系和探讨其治疗方法提供一定的理论依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Zhu P J, Krnjević K. Persistent block of CA1 synaptic function by prolonged hypoxia[J]. *Neuroscience*, 1999, 90: 759-770.
- [2] Lukyanetz E A, Shkryl V M, Kravchuk O V, Kostyuk P G. Action of hypoxia on different types of calcium channels in hippocampal neurons[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1618: 33-38.
- [3] Yao H, Haddad G G. Calcium and pH homeostasis in neurons during hypoxia and ischemia[J]. *Cell Calcium*, 2004, 36(3-4): 247-255.
- [4] Tjong Y W, Jian K, Li M, Chen M, Gao T M, Fung M L. Elevated endogenous nitric oxide increases Ca²⁺ flux via L-type Ca²⁺ channels by S-nitrosylation in rat hippocampal neurons during severe hypoxia and *in vitro* ischemia[J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42: 52-63.
- [5] Shimoda L A, Polak J. Hypoxia. 4. Hypoxia and ion channel function[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300: C951-C967.

- [6] Krainc D, Wemlinger T A, Neff N H, Hadjiconstantinou M. Neonatal hypoxia; early neurotransmitter responses and the consequences of treatment with GM1 ganglioside [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 271:1299-1305.
- [7] Bona E, Andersson A L, Blomgren K, Gilland E, Puka-Sundvall M, Gustafson K. Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats[J]. *Pediatr Res*, 1999, 45(4 Pt 1):500-509.
- [8] Di Loreto S, Maccarone R, Corvetti L, Sebastiani P, Piancatelli D, Adorno D. Differential modulation of interleukin-6 expression by interleukin-1 β in neuronal and glial cultures[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2003, 14:97-102.
- [9] Vecil G G, Larsen P H, Corley S M, Herx L M, Besson A, Goodyer C G, et al. Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma *in vivo* [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61:212-224.
- [10] Loddick S A, Turnbull A V, Rothwell N J. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18:176-179.
- [11] Frei K, Malipiero U V, Leist T P, Zinkernagel R M, Schwab M E, Fontana A. On the cellular source and function of interleukin-6 produced in the central nervous system in viral diseases [J]. *Eur J Immunol*, 1989, 19:689-694.
- [12] Gorina R, Petegnief V, Chamorro A, Planas A M. AG490 prevents cell death after exposure of rat astrocyte to hydrogen peroxide or proinflammatory cytokines; involvement of the Jak2/STAT pathway[J]. *J Neurochem*, 2005, 92:505-518.
- [13] Lin J Y, Seguin R, Keller K, Chadee K. Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene [J]. *Infect Immun*, 1994, 62:1534-1541.
- [14] Jander S, Schroeter M, Stoll G. Role of NMDA receptor signaling in the regulation of inflammatory gene expression after focal brain ischemia [J]. *J Neuroimmunol*, 2000, 109:181-187.
- [15] 李亚宝, 米志宽. 新生儿缺氧缺血性脑病白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子- α 水平变化及与脑损伤关系的研究[J]. *中国现代儿科学杂志*, 2007, 4:105-107.
- [16] Barger S W, Hörster D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglstein J, Mattson M P. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity; evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:9328-9332.
- [17] Deng Y Y, Lu J, Sivakumar V, Ling E A, Kaur C. Amoeboid microglia in the periventricular whiter matter induce oligodendrocyte damage through expression of proinflammatory cytokines via MAP kinase signaling pathway in hypoxia neonatal rats[J]. *Brain Pathol*, 2008, 18:387-400.
- [18] Fitzgerald J P, Nayak B, Shanmugsundaram K, Friedrichs W, Sudarshan S, Eid A A, et al. Nox4 mediates renal cell carcinoma cell invasion through hypoxia-induced interleukin6- and 8-production[J]. *PLoS One*, 2012, 7:e30712.
- [19] Di Loreto S, Corvetti L, Maccarone R, Piancatelli D, Adorno D. Interleukin 1-beta modulates the effects of hypoxia in neuronal culture[J]. *J Neuroimmunol*, 2000, 106(1-2):32-42.
- [20] Ha M K, Song Y H, Jeong S J, Lee H J, Kim B, Song H S, et al. Emodin inhibits proinflammatory responses and inactivates histone deacetylase 1 in hypoxic rheumatoid synoviocytes[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34:1432-1437.
- [21] Li F, Lu J, Wu C Y, Kaur C, Sivakumar V, Sun J, et al. Expression of Kv1. 2 in microglia cytokines and its putative roles in modulating production of proinflammatory cytokines and reactive oxygen species[J]. *J Neurochem*, 2008, 106:2093-2105.
- [22] Li F, Wang L, Li J W, Gong M, He L, Feng R, et al. Hypoxia induced amoeboid microglial cell activation in postnatal rat brain is mediated by ATP receptor P2X4[J]. *BMC Neurosci*, 2011, 12:111.
- [23] Kaur C, Sivakumar V, Yip G W, Ling E A. Expression of syndecan-2 in the amoeboid microglial cells and its involvement in inflammation in the hypoxic developing brain[J]. *Glia*, 2009, 57:336-349.
- [24] Jeong H J, Hong S H, Park R K, Shin T, An N H, Kim H M. Hypoxia-induced IL-6 production is associated with activation of MAP kinase, HIF-1, and NF-kappa B on HEI-OC1 cells[J]. *Hear Res*, 2005, 207(1-2):59-67.