

## MIF调节巨噬细胞系 RAW264.7 中 TNF- $\alpha$ II型受体的表达\*

王启宇<sup>1,2)</sup> 王 惟<sup>1)</sup> 乔晓杭<sup>1)</sup> 唐 捷<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

<sup>2)</sup>中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027)

**摘要** 巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)在调节固有免疫和获得性免疫中发挥重要作用,在炎症、败血症和自身免疫疾病中都有它的参与.MIF可以刺激巨噬细胞表达 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8 等多种细胞因子.在最近的研究中发现,外源性的 MIF 可以上调 RAW264.7 细胞中 TNF- $\alpha$  II型受体的 mRNA 水平,细胞自分泌的 MIF 对维持 TNF- $\alpha$  II型受体的基线水平有很大作用.这种调节作用可以被 Src 和 JNK 抑制剂所阻断.在巨噬细胞活化过程中, MIF 这一新发现的功能提示它在放大炎症信号的同时,还能消减 TNF- $\alpha$  可能引起的凋亡和细胞毒等副作用.

**关键词** 巨噬细胞迁移抑制因子(MIF), 肿瘤坏死因子 II型受体(TNFR II), Src, JNK

**学科分类号** Q7

巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)作为一个细胞因子在固有性免疫系统中发挥着重要的作用.脂多糖(LPS)、肿瘤坏死因子 - $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、干扰素 - $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )等可以刺激巨噬细胞释放 MIF,当 MIF 释放到组织或在全身循环时,它充当一个经典的促炎症细胞因子,通过巨噬细胞、T 细胞活化而促进固有性和适应性免疫应答.用 MIF 缺失的细胞,特异性 MIF 抗体或重组 MIF 进行实验,发现 MIF 直接或间接促进一组促炎症分子的生成和表达,包括细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-8),巨噬细胞炎症蛋白 2, 一氧化氮, COX2 和花生四烯酸途径产物等<sup>[1~3]</sup>.

在炎症当中, LPS 刺激巨噬细胞会分泌 IL-6, TNF- $\alpha$  和 MIF 等一系列细胞因子. TNF- $\alpha$  刺激巨噬细胞会导致 MIF 等细胞因子的释放,而 MIF 刺激巨噬细胞又会分泌 TNF- $\alpha$  等细胞因子,构成了一个复杂的细胞因子网络<sup>[4]</sup>.从时间上分析,在脂多糖(LPS)刺激之后, TNF- $\alpha$  出现较早,而尾随其后的 MIF 又可以引起新一轮 TNF- $\alpha$  的释放.但是前后两轮 TNF- $\alpha$  的作用是否一致, MIF 出现在 TNF- $\alpha$  之后是否有其特定的意义,尚不清楚.

最近的研究发现, MIF 也可以调节某些细胞因子受体的表达<sup>[5,6]</sup>.在对鼠源巨噬细胞的研究中,我

们首次发现了外源加入 MIF 可以诱导 TNF- $\alpha$  II型受体(TNFR- II)的高表达,却不影响 I型受体(TNFR- I).我们通过 RNAi 技术和多种细胞信号抑制剂对于 MIF 的这一新机制进行了研究.

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

信号转导抑制剂 SB203580 (Cat. No.559389), SP600125 (Cat. No.420119), PD98059 (Cat. No. 513000), H89 (Cat. No.371963), PP2 (Cat. No. 529573)和 ISO-1 (Cat. No. 475837) 购于 Merck 公司. Ni-NTA His-Bind Resin 和 pET-41a 载体购自 Novagen 公司.分子克隆实验中所用的酶购于 Takara 公司和 NEB 公司.

#### 1.2 细胞培养

RAW264.7 细胞来源于 ATCC, 使用含有 10% 胎牛血清, 无内毒素 DMEM 培养.  $2.5 \times 10^5$  个 /ml 的细胞转入 30 mm 细胞培养皿, 继续培养 24 h

\*国家自然科学基金资助项目(30671912).

\*\* 通讯联系人. Tel: 010-64888447, E-mail: jtang@ibp.ac.cn

收稿日期: 2007-04-06, 接受日期: 2007-04-30

后, 换新的培养基进行 MIF 刺激实验. 抑制试剂在 MIF 刺激之前 30 min 加入.

### 1.3 RNA 干扰

RAW264.7 细胞在六孔细胞培养板中培养( $8 \times 10^5$  个 / 孔) 24 h, 达到 80% 接触度后, 使用 LipofectAMINE 2000 转染试剂 (Invitrogen Life Technologies) 转染 CD74 RNAi (BC61489; GenePharma 公司) 进入细胞, 继续培养 7 h 后, 撤去转染培养基, 换成正常培养基, 继续培养 48 h

后, 提取总 RNA 进行检测.

### 1.4 总 RNA 的提取及 RT-PCR

采用 Trizol 试剂提取 RAW264.7 细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定纯度并定量, Oligo dT 为引物, 用反转录酶(M-MLV, Promega 公司)合成 cDNA. 设计引物(表 1)进行 PCR 反应. 反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  10 min, ( $94^{\circ}\text{C}$  30 s,  $52^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s) 32 个循环或 40 个循环,  $72^{\circ}\text{C}$  补充 10 min 后,  $4^{\circ}\text{C}$  冷却 30 min.

Table 1 Sequences of primers used for the amplification of PCR

Primers	Forward	Reverse	Length/bp
$\beta$ -actin	5' AGGACTCCTATGTGGGTGAC 3'	5' GCCACAGGATTCCATACCCA 3'	671
TNFR- I	5' CCATCTTCGGTCCTAGTAACTG 3'	5' CAGGTTTCATCTTGAAAGCAC 3'	391
TNFR- II	5' GATGCCAAGGTGCCTCATG 3'	5' GAGCTGCTACAGACGTTACAG 3'	290
TNF- $\alpha$	5' GCGGAGTCCGGGCAGGTCTA 3'	5' GGGGGGCTGGCTCTGTGAGG 3'	459

## 2 结 果

### 2.1 MIF 上调 TNFR- II mRNA 的表达, 而不影响 TNFR- I mRNA

利用重组的人源 MIF(3 mg/L)刺激 RAW264.7

细胞 8 h 后, 收取细胞, 提取 RNA 并做 RT-PCR 分析. 结果显示, 与对照相比, MIF 可以上调 TNFR- II 的表达超过 4 倍, 却对 TNFR- I 的表达几乎没有影响(图 1).

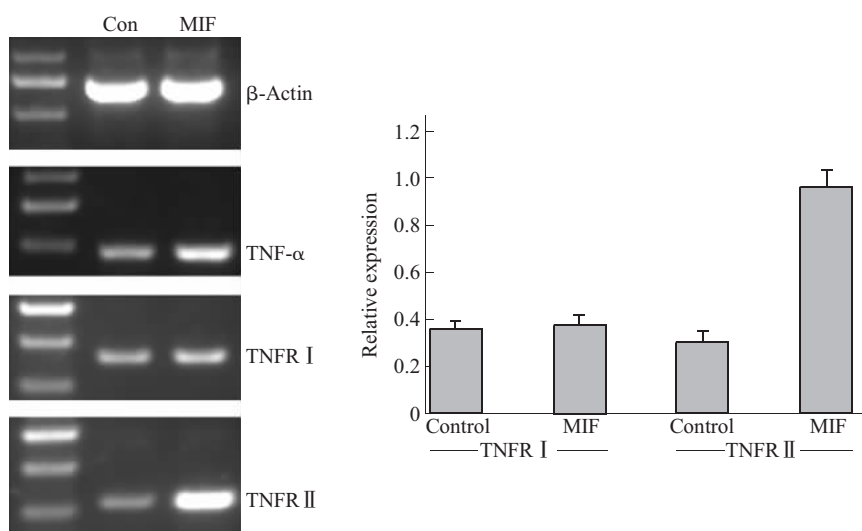


Fig. 1 Effect of rMIF on the transcription of TNF- $\alpha$ , TNFR- I and TNFR- II mRNA

RAW264.7 cells were treated with or without rMIF (3 mg/L) for 8 h. mRNA was extracted and RT-PCR was done with primers specific to  $\beta$ -actin, TNF- $\alpha$ , TNFR I and TNFR II. PCR products were separated by electrophoresis on 1% agarose gel.

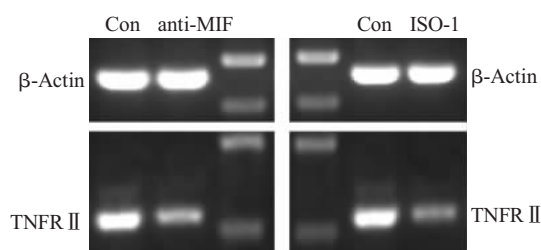
### 2.2 TNFR- II 的正常表达需要细胞分泌的 MIF 来维持

为了研究正常情况下 RAW264.7 细胞本身所

表达的 TNFR- II mRNA 是否受 MIF 影响, 我们使用 MIF 的特异性抑制剂 ISO-1<sup>[7]</sup> (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 和 anti-MIF (2 mg/L) 中和性单克隆抗体(实验室自制)

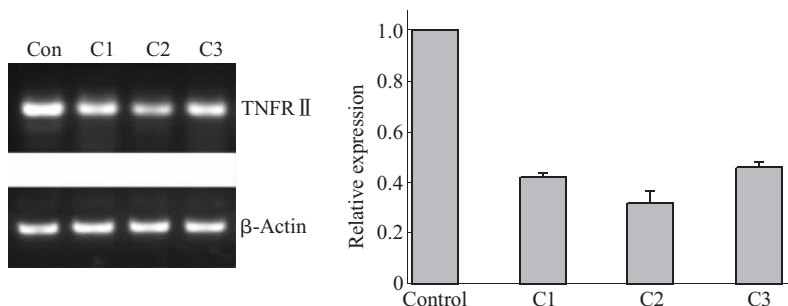
来抑制细胞自分泌的 MIF 的功能. 研究发现, 在经过 ISO-1 和 anti-MIF 作用 8 h 后, 细胞内 TNFR- II 的表达水平被明显降低(图 2). 说明 TNFR- II 的正常表达需要 MIF 来维持.

CD74 是 MIF 的细胞表面受体<sup>[8]</sup>, 如果 TNFR II 的表达受到细胞自分泌 MIF 的调控, 则降低 CD74 的表达量有可能同时降低 TNFR II 的表达. 我们用 RNAi 干扰的方法降低了细胞内 CD74 mRNA 的水平(数据未列出), 结果发现 TNFR- II 的正常表达受到抑制(图 3). 说明 TNFR- II 的正常表达需要 MIF 受体 CD74 的参与. 这进一步说明了是细胞自分泌的 MIF 维持着 TNFR- II 的表达水平.



**Fig. 2 Blockage of MIF activity led to a reduction of the TNFR- II mRNA level**

RAW264.7 cells were incubated with anti-MIF antibody (2 mg/L) or ISO-1 (100  $\mu$ mol/L) for 8 h. mRNA was extracted and RT-PCR was done with primers specific to  $\beta$ -actin and TNFR- II. PCR products were separated by electrophoresis on 1% agarose gel.



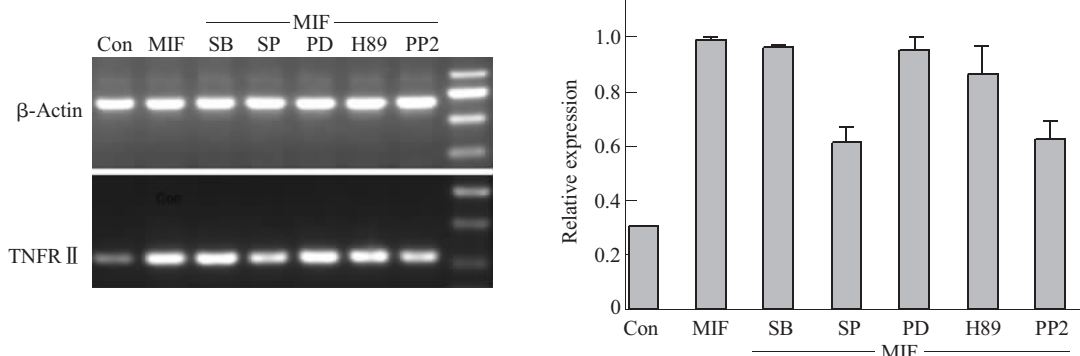
**Fig. 3 CD74 specific RNAi down-regulated TNFR- II mRNA level**

Raw264.7 cells were transfected with three versions of CD74 specific RNAi (C1, C2 and C3) for 48 h. mRNA was extracted and RT-PCR was done with primers specific to  $\beta$ -actin and TNFR II. PCR products were separated by electrophoresis on 1% agarose gel.

### 2.3 MIF 通过激活 Src-JNK 信号通路来上调 TNFR- II 的表达

为了研究 MIF 是通过什么信号转导通路来上调 TNFR- II 表达的, 我们使用了多种细胞信号转导抑制剂. 在抑制剂提前处理细胞 30 min 后, 使用

重组 MIF(3 mg/L)刺激 RAW264.7 细胞. 结果发现, 只有 JNK 抑制剂 SP600125 和 Src 抑制剂 PP2 可以较明显地影响到 TNFR- II 的上调. 而 Erk1/2 抑制剂 PD98059、p38 抑制剂 SB203580、PKA 抑制剂 H89 则对于 TNFR- II 的上调都没有什么影响(图 4).



**Fig. 4 MIF activates the Src-JNK pathway to up-regulate the expression of TNFR- II**

RAW264.7 cells were pre-incubated with inhibitors for 0.5 h and stimulated with rMIF (3 mg/L) for additional 8 h. mRNA was extracted and RT-PCR was done with primers specific to  $\beta$ -actin and TNFR- II. PCR products were separated by electrophoresis on 1% agarose gel. SB=SB203580 (p38 inhibitor); SP=SP600125 (JNK inhibitor); PD=PD98059 (Erk inhibitor); H89 (PKA inhibitor); PP2 (Src kinase inhibitor).

这说明了 MIF 是通过激活 Src-JNK 信号通路来上调 TNFR- II 的表达。

### 3 讨 论

TNF- $\alpha$  及其受体在免疫调节中发挥着重要的功能. TNF- $\alpha$  主要有 2 种细胞膜表面受体, 分别是 TNF- $\alpha$  I 型受体(TNFR- I; p55; CD120a)和 II 型受体 (TNFR- II; p75; CD120b)<sup>[9]</sup>. 它们两者之间的主要区别在于其下游的信号转导通路不同. TNFR- I 属于可以与 TRADD(TNF- $\alpha$  受体相关的死亡蛋白)结合的 TNF- $\alpha$  超家族受体, 它具有促进凋亡的功能. 而 TNFR- II 则属于不与死亡蛋白结合的一类受体, 它直接与 TNF- $\alpha$  受体结合因子家族的成员结合, 主要转导促炎症反应信号<sup>[10, 11]</sup>.

在炎症反应中, 过多的 TNF- $\alpha$  可以引起细胞的凋亡并有可能导致肌体死亡<sup>[12]</sup>. 而我们发现炎症反应分泌的 MIF 可以上调 TNFR- II 的表达而不影响 TNFR- I, 这预示着细胞表面 TNFR- I 所占比例的相对下降. 通过这种方式, TNF- $\alpha$  的信号通路会被 MIF 改变, 凋亡信号被减弱而促炎症作用被加强. 巨噬细胞在避免凋亡的同时能够更持久地分泌炎症因子, 发挥促炎症作用. 我们下一步的工作就是要在功能方面验证这一假说.

编码 TNFR- II 基因的上游启动子受到 AP-1, CK-2, IL-6RE, GAS, NF- $\kappa$ B 和 SP1 等转录因子的调控<sup>[13]</sup>. 在我们的研究中发现, MIF 通过 Src-JNK 信号通路来激活 AP-1, 而上调 TNFR- II 的表达.

正常生理情况下, MIF 在血液中保持一定的水平, 而这一现象在其他细胞因子当中是极为少见的<sup>[14, 15]</sup>. 在我们的研究中发现, 巨噬细胞正常表达 TNFR- II 需要 MIF 的参与, 这可能是维持一定 MIF 浓度的重要性之一. 此外, 在经过刺激后, 血液当中 MIF 浓度会有较大提高. 而在败血症病人、关节炎病人以及动脉粥样硬化病人体内, MIF 可以达到几十甚至几百纳克每毫升的浓度, 在局部微环境中可能会更高. 在我们的实验中, 相对低浓度的 MIF 也可以诱导一定量的 TNFR- II, 但是结果不够显著, 因此采用较高浓度的 MIF 进行实验.

Toh 等<sup>[16]</sup>在 MIF<sup>-/-</sup>鼠内发现, TNFR- I 的表达需要 MIF 来维持. 与对照组比, MIF 基因缺失小鼠的皮肤纤维原细胞表达较低水平的 TNFR- I, 在转染 MIF 质粒后, 这一反常得以恢复. 在我们的实验中, 我们用外加 MIF 刺激巨噬细胞, 没有发现 TNFR- I 有明显的提高. 可能在正常生理情况下

TNFR- I 需要基础水平的 MIF 来维持, 而在病理情况下受较高浓度的 MIF 刺激后 TNFR- I 却不会大幅度提高. 此外, MIF<sup>-/-</sup>鼠的皮肤纤维原细胞与我们研究的小鼠巨噬细胞系可能存在着一些比较大的差异. 在我们的下一步工作当中, 我们将对巨噬细胞中 2 种 TNF- $\alpha$  受体表达量变化的生理意义进行进一步的研究.

### 参 考 文 献

- 1 Baugh J A, Donnelly S C. Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. *J Endocrinol*, 2003, **179** (1): 15~23
- 2 Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 2003, **3** (10): 791~800
- 3 Morand E F. New therapeutic target in inflammatory disease: macrophage migration inhibitory factor. *Intern Med J*, 2005, **35** (7): 419~426
- 4 Riedemann N C, Guo R F, Ward P A. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med*, 2003, **9** (5): 517~524
- 5 Roger T, David J, Glauser M P, *et al*. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*, 2001, **414** (6866): 920~924
- 6 Toh M L, Aeberli D, Lacey D, *et al*. Regulation of IL-1 and TNF receptor expression and function by endogenous macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol*, 2006, **177** (7): 4818~4825
- 7 Al-Abed Y, Dabideen D, Aljabari B, *et al*. ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis. *J Biol Chem*, 2005, **280** (44): 36541~36544
- 8 Leng L, Metz C N, Fang Y, *et al*. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*, 2003, **197** (11): 1467~1476
- 9 Tartaglia L A, Goeddel D V. Two TNF receptors. *Immunol Today*, 1992, **13** (5): 151~153
- 10 Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998, **281** (5381): 1305~1308
- 11 Wallach D, Varfolomeev E E, Malinin N L, *et al*. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*, 1999, **17**: 331~367
- 12 Varfolomeev E E, Ashkenazi A. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?. *Cell*, 2004, **116** (4): 491~497
- 13 Liz-Grana M, Gomez-Reino Carnota J J. Tumour necrosis factor. Genetics, cell action mechanism and involvement in inflammation. *Alergol Inmunol Clin*, 2001, **16**: 140~149
- 14 Sakai Y, Masamune A, Satoh A, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 2003, **124** (3): 725~736
- 15 Yamaguchi E, Nishihira J, Shimizu T, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in bronchial asthma. *Clin Exp Allergy*, 2000, **30** (9): 1244~1249

## MIF Regulates TNF Alpha Receptor Type II Expression in RAW264.7 Cells\*

WANG Qi-Yu<sup>1,2)</sup>, WANG Wei<sup>1)</sup>, QIAO Xiao-Hang<sup>1)</sup>, TANG Jie<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

<sup>2)</sup> School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

**Abstract** Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays an important role in the regulation of the innate and adaptive immunity and is implicated in inflammation, sepsis and autoimmune disease. Previous works have shown that MIF could induce the expression of many cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 in macrophage. It was reported here that MIF up-regulates the type II TNF- $\alpha$  receptor (p75 TNFR) expression at mRNA level in RAW264.7 cell line. When RAW264.7 cells were treated with MIF inhibitor, antibody neutralizing MIF activities or the siRNA specific to MIF receptor CD74, the baseline TNFR II mRNA level was reduced. Using inhibitors specific to Erk, JNK, p38, Src or PKA, it was demonstrated that MIF regulation of TNFR II mRNA expression is mediated by Src and JNK. The up-regulation of the TNF- $\alpha$  type II receptor by MIF suggests a mechanism of amplifying inflammatory signals while avoiding side effects of TNF- $\alpha$ , such as apoptosis or cytotoxicity during macrophage activation.

**Key words** macrophage migration inhibitory factor (MIF), TNF receptor type II (TNFR II), Src, c-Jun N-terminal kinase (JNK)

---

\*This work was supported by a grant from The Natural Science Foundation of China (30671912).

\*\*Corresponding author . Tel: 86-10-64888447, E-mail: jtang@ibp.ac.cn

Received: April 6, 2007 Accepted: April 30, 2007