论著

文章编号:1000-5404(2007)14-1388-03

锌指蛋白A20对人单核细胞LPS应答的影响

吴丽娟[1],刘国栋[2],陈 伟[1],蒋建新[2],朱佩芳[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]检验科,[2]第四研究室,全军交通医学研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 调查锌指蛋白A20表达对人单核细胞LPS应答的影响,探讨A20可能的炎症调控作用与机制及其潜在的临床应用价值。**方法** 采用细胞转染技术制备锌指蛋白A20人单核细胞转基因细胞模型和基因沉默细胞模型,以LPS攻击细胞,用适时荧光定量PCR技术测定锌指蛋白A20表达水平,用ELISA技术分析细胞核转录因子NF-κB活性及其依赖性炎性细胞因子TNF-α水平。**结果** 锌指蛋白A20过表达组细胞遭受LPS攻击后其NF-κB活性和TNF-α水平明显低于LPS对照组($P<0.01$),锌指蛋白A20基因表达抑制组细胞其NF-κB活性和TNF-α水平明显高于LPS对照组($P<0.01$)。**结论** 锌指蛋白A20对人单核细胞LPS应答具有明显的调节作用,可以明显降低炎症重要核转录因子活性和降低促炎细胞因子的表达。对脓毒症过度炎症反应实施干预具有潜在的临床应用价值。

关键词: 锌指蛋白A20;单核细胞;内毒素;RNA干扰技术;NF-κB;TNF-α

中图法分类号: R341;R392.11;R392.32 **文献标识码:** A

Effects of zinc finger protein A20 on lipopolysaccharide responses in human monocytes

WU Li-juan[1], LIU Guo-dong[2], CHEN Wei[1], JIANG Jian-xin[2], ZHU Pei-fang[2] ([1]Department of Medical Laboratory, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of zinc finger protein A20 expression on lipopolysaccharide (LPS) response in human monocytes so as to discuss its regulation roles and mechanism to inflammation *in vivo* and its potential value of clinical application. Methods Cell transfection technique was respectively used to make zinc finger protein A20 transgenic cell model and gene silence cell model, both of which were then treated with LPS. Real-time reverse PCR was employed to analyze the expression of zinc finger protein A20 and ELISA to determine the activity of nuclear transcription factor NF-κB and the levels of dependent inflammatory cytokines including tumor necrosis factor (TNF) alpha. Results After LPS treatment, the NF-κB activity and the TNF-alpha level were significantly lower in the cells with overexpressed zinc finger protein A20 than LPS control cells ($P<0.01$), but significantly higher in zinc finger protein A20 gene silenced cells ($P<0.01$). Conclusion Zinc finger protein A20 can effectively regulate LPS responses in human monocytes and markedly abate expressions of important nuclear factors and proinflammatory cytokines, proving that zinc finger protein A20 has potential clinical value for over inflammatory reaction of sepsis.

Key words: zinc finger protein A20; monocytes; lipopolysaccharide; RNA interference technique; nuclear factor-κB; tumor necrosis factor-α

内毒素(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性杆菌外膜的重要组成成分,可以激活单核巨噬细胞,从而诱导细胞产生各种各样的炎性细胞因子,引发体内炎症反应。一旦体内炎症反应过度,将导致休克、全身炎症反应综合征(system inflammatory response syndrome, SIRS),甚至发生多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)等,是临床创伤患者后期死亡的重要原因之一[1]。因此,开展炎症效应细胞LPS应答信号转导途径的研究,特别是体内该信号转导途径负向调控机制的研究,可以为临床干预体内过度炎症反应提供新措施。锌指蛋白A20(zinc finger protein A20, A20)是细胞凋亡研究中发现的一种肿瘤坏死因子-α(TNF-α)应答基因的编码产物[2],后来的研究却表明A20不仅具有抗凋亡的功能,而且能够抑

基金项目:全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MA189)
Supported by the General Program of the "Eleventh Five-Year Plan" of PLA (06MA189)

作者简介:吴丽娟(1965-),女,四川省成都市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事临床感染与免疫方面的研究,发表论文40余篇。电话:(023)68757972,E-mail:wulijuan1638@126.com

收稿日期:2006-06-29;修回日期:2006-09-15

制血管内皮细胞的 NF-κB 活性[3]。本研究采用 LPS 攻击人单核细胞所致的细胞炎症反应模型和体外转染技术,研究 A20 过表达及 A20 表达缺如对人单核细胞 LPS 应答的影响,探讨 A20 潜在的临床应用前景。

1　材料与方法

1.1　主要材料

pcDNA3.1-Flag-hA20 质粒由美国 Michigan 大学医学院病理系 Vincenz C. 博士惠赠(已经过测序验证),pSUPER-EGFP1-A20 siRNA 质粒本实验室自行构建。RPMI1640 培养液、小牛血清为 Gibco 产品,Flag 单克隆抗体、脂质体转染试剂为 Invitrogen 产品,LPS *E. coli.* 026:B6 为 DIFCO 产品,APES 为 Sigma 产品,鼠抗人 A20 IgG1 单克隆抗体为 Active Motif 产品,生物素化羊抗鼠 IgG、链霉菌抗生物素蛋白-碱性磷酸酶(SP-AP)、TNF-α ELISA 试剂盒为为美国 R&D 产品,Tripure 为 Roche 产品,逆转录试剂盒、适时荧光定量 PCR 试剂盒为 TaKaRa 公司产品,NBT/BCIP 溶液、BCA 蛋白定量试剂盒为上海申能博彩生物科技公司产品,细胞裂解液 RIPA、核蛋白提取试剂盒为 Pierce 产品,NF-κB 检测试剂盒为 Active motif 产品,其他为国产分析纯试剂。PCR 引物及 *Taq* Man 探针由上海生工生物科技公司完成。

1.2　主要方法

1.2.1　细胞实验　　将 THP1 细胞悬浮于含 10% FCS 的 RPMI1640 培养基中,37 ℃ 5% CO_2 条件下培养,2 ~ 3 d 换液传代 1 次。转染前 1 d 换液传代细胞,继续 37 ℃ 5% CO_2 培养过夜,200 × *g* 离心 10 min 收集细胞,用无 FCS 的 RPMI1640 培养液重悬细胞,调细胞浓度至 5×10^6/ml,800 μl/孔接种 6 孔板。实验设对照组、无干预组、过表达组和表达抑制组。将对照组和无干预组直接放入 37 ℃ 5% CO_2 培养箱中培养。过表达组分别以 5 μg/孔 pcDNA3.1-Flag-hA20 质粒转染细胞,表达抑制组分别以 5 μg/孔 pSUPER EGFP1-hA20 质粒转染细胞,继续 37 ℃ 5% CO_2 培养 6 h。向全部细胞孔加入 4 ml 含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液,在无干预组、A20 过表达组和表达抑制组各孔中加入终浓度为 100 ng/ml 的 LPS,继续培养 24 h,离心收集细胞和培养上清液。

1.2.2　Flag 报告基因表达的检测　　采用 ELISA 法进行。

1.2.3　EGFP 报告基因表达分析　　采用流式细胞术测定。在美国 BECKMAN-COULTER XL-MCL 流式细胞仪上,以激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,先用未转染 THP1 细胞进行调零,再测定实验管,记录通道 FL1 绿色荧光阳性细胞的百分率。

1.2.4　A20 表达分析

1.2.4.1　总 RNA 提取　　采用 SDS/Phenol 法快速提取细胞总 RNA[4]并测定 *D*(260)和 *D*(280)值,计算总 RNA 浓度。

1.2.4.2　cDNA 合成　　采用 AMV 逆转录酶法,加样按照试剂盒说明书进行。反应总体积 10 μl,总 RNA 模板 250 ~ 300 ng,25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μl,10 × 逆转录反应缓冲液 1 μl,各 10 mmol/L的 dNTPs 混合物 1 μl,RNA 酶抑制剂 0.25 μl,5 U/μl AMV 逆转录酶 0.5 μl,Oligo dT-Adaptor 引物 0.5 μl,以无 RNA 酶的灭菌水补充体积到 10 μl,混均后稍离心。PCR 仪上 42 ℃反应 30 min,然后 99 ℃加热 5 min,冰浴保存备用。

1.2.4.3　A20 表达测定　　采用适时荧光定量 PCR 法,PCR 加样参照试剂盒说明书进行。设计上游引物序列为 5′-ATGCACCGATACACACTGGA-3′(20 bp),下游引物序列为 5′-CACAAGCTTCCGGACTTCTC-3′(20 bp),扩增产物长 153 bp。*Taq* Man 探针序列为 5′-CCAGGCCACCCTGGA-3′(15 bp),采用 5′端 FAM 标记。反应总体积 25 μl,cDNA 合成物 1 μl,5 × 适时定量 PCR 缓冲液 5 μl,各 10 mmol/L的 dNTPs 混合物 0.75 μl,250 mmol/L $MgCl_2$ 0.5 μl,10 μmol/L 的引物各 0.5 μl,5 μmol/L 探针 0.6 μl,5 U/μl TaKaRa *Ex Taq* HS 0.25 μl,以灭菌水补充体积到 25 μl,混匀后稍离心。PCR 反应条件:94 ℃ 4 min,然后 94 ℃ 30 s→60 ℃ 1 min,共循环 45 次。实验同时设阳性对照、阴性对照、标准孔[5]。全部结果自动保存在 Icycle 扩增仪上,自动换算为拷贝数/ml 报告结果,最后换算成 log(拷贝数)/ml 进行统计。

1.2.5　NF-κB 活性测定　　采用 ELISA 法,加样按试剂盒说明书并参照文献[6,7]方法进行。NF-κB 活性以测得的 *D*(450)/*D*(660)值表示。

1.2.6　TNF-α 测定　　采用 ELISA 试剂盒并按文献[7]方法进行。

1.3　统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Microsoft Excel 2003 软件对计量资料进行 *t* 检验。

2　结果

2.1　报告基因表达的检测

2.1.1　Flag 表达测定　　对照组、无干预组、过表达组和表达抑制组反映细胞 Flag 报告基因表达的 *D*(450)值分别为(0.041 ± 0.012)、(0.042 ± 0.016)、(0.511 ± 0.084)和(0.042 ± 0.012)。分别将无干预组、过表达组和表达抑制组与对照组进行比较,经 *t* 检验,过表达组与对照组之间 Flag 报告基因表达水平存在显著性差异($P < 0.01$),其余各组与对照组之间 Flag 报告基因表达水平无显著性差异($P > 0.05$)。该结果表明,过表达组细胞内存在 Flag 报告基因的表达,提示质粒 pcDNA3.1-Flag-hA20 提供的外源性 A20 基因在转染细胞中得以成功表达。

2.1.2　EGFP 表达测定　　表达抑制组 EGFP 阳性细胞百分比占(67 ± 4)%,其余各组无 EGFP 阳性细胞。提示表达抑制组大多数细胞内可以自动合成导致 A20 基因沉默的 siRNA。

2.2　A20 表达的测定

对照组、无干预组、过表达组和表达抑制组 A20 表达水平分别为(3.18 ± 0.29)、(5.42 ± 0.56)、(8.14 ± 0.79)、(3.99 ± 0.48) log(拷贝数)/ml。*t* 检验显示无干预组和过表达组与对照组 A20 表达水平之间存在极显著性差异($P < 0.01$),表达抑制组和对照组之间 A20 表达水平无显著性差异($P > 0.05$);过表达组 A20 表达水平明显高于无干预组($P < 0.01$),表达抑制组 A20 表达水平明显低于无干预组($P < 0.05$)。上述结果表明,对照组和表达抑制组 A20 表达微弱,无干预组 A20 表达较高,过表达组 A20 表达极高;转染 pcDNA3.1-Flag-hA20 质粒的过表达组和转染 pSUPER EGFP1-hA20 质粒的表达抑制组,分别达到了预期的 A20 高表达和 A20 表达被抑制之目标。

2.3　NF-κB 活性分析

对照组、无干预组、过表达组和表达抑制组表示 NF-κB 活

性的 $D(450)/D(660)$ 值分别为(0.11±0.03)、(0.26±0.03)、(0.02±0.07)和(0.41±0.07)。t 检验显示无干预组和表达抑制组 NF-κB 活性水平较对照组明显升高($P<0.01$),过表达组 NF-κB 活性水平较无干预组明显降低($P<0.01$),无干预组与表达抑制组之间 NF-κB 活性有显著性差异($P<0.05$)。上述结果表明,在过表达组,LPS 对人单核细胞的活化被大量表达的 A20 抑制;在表达抑制组,由于缺乏足够多的 A20 表达,人单核细胞被 LPS 广泛活化。

2.4 TNF-α 水平分析

对照组、无干预组、过表达组和表达抑制组细胞培养上清液中 TNF-α 水平分别为(163±41)、(433±14)、(53±14) pg/ml 和(594±73) pg/ml。t 检验显示无干预组和表达抑制组与对照组之间 TNF-α 水平存在极显著性差异($P<0.01$),过表达组与无干预组之间 TNF-α 水平存在极显著性差异($P<0.01$),表达抑制组与无干预组之间 TNF-α 水平存在显著性差异($P<0.05$)。上述结果表明,在过表达组,由于大量人单核细胞的活化被抑制,细胞合成并分泌到培养液中的 TNF-α 减少;在表达抑制组,由于存在大量活化的人单核细胞,细胞合成并分泌到培养液中的 TNF-α 增加。

3 讨论

脓毒症治疗至今仍然是全球范围内急待解决的医学难题,其发病机制涉及感染、炎症、免疫反应等多个领域,并伴有凝血系统功能的改变,是临床多种并发症发生的重要环节和病理基础。因此,脓毒症的治疗也是一个综合性概念。当前脓毒症的治疗主要包括感染病灶的清除、抗生素治疗和器官支持治疗,但是脓毒症的发病率和病死率仍然高居不下,对炎症反应的干预效果较差。为此,近年来学者们纷纷赞同针对 LPS、促炎细胞因子及其受体、组织因子、凝血系统等开展干预性治疗。干预性治疗措施如 LPS 拮抗、促炎细胞因子及其受体拮抗、抗组织因子和抗凝治疗等在动物实验阶段取得了明显的疗效,但在临床研究中都没有取得明显的治疗效果。令人欣慰的是,在大部分炎症干预措施研究失败的同时,重组人活化蛋白 C(recombinant human activated protein, rhAPC)在脓毒症治疗中取得了成功[8]。rhAPC 具有抗炎、抗血栓、抗纤溶的功效,能够降低脓毒症的病死率,延长存活时间,避免使用呼吸机和预防休克的发生,是目前唯一被认可的用于严重脓毒症患者的生物制剂。但是,使用 rhAPC 具有严重的出血倾向,临床应用风险大。因此,继续寻找毒副作用小的炎症干预措施仍然是当前人们共同面临的课题。

Lee 等[9]发现锌指蛋白 A20 缺陷小鼠对 LPS 和 TNF-α 的敏感性异常增高,注射 5 mg/kg 的 LPS 或 0.1 mg/kg 的 TNF-α,2 h 内小鼠全部死亡。野生型对照组小鼠即使注射 25 mg/kg 的 LPS 或 0.4 mg/kg 的 TNF-α,小鼠仍然能够全部存活。Arvelo 等[10]的研究表明,前炎症刺激因素可以诱导肝细胞表达 A20,A20 的表达返过来可以抑制 NF-κB 活性,保护肝细胞免于发生大面积凋亡。上述研究成果提示了 A20 可能的炎症调节作用。

单核巨噬细胞是体内脓毒症炎症反应的主要效应细胞之一,我们以 LPS 攻击人单核细胞株 THP1 作为细胞炎症应答模型,观察锌指蛋白 A20 对人单核细胞 LPS 应答的影响,探讨 A20 可能的炎症调控作用及其机制。被激活的人单核细胞,细胞内核因子 NF-κB 活性增高,导致细胞合成并分泌的炎症细胞因子增加。因此,本研究以 LPS 攻击人单核细胞的细胞炎症反应为模型,以细胞内 NF-κB 活性水平为人单核细胞被活化并发生炎症应答的直接证据,以细胞分泌到培养液中的炎症重要细胞因子 TNF-α 水平进一步验证细胞的炎症应答程度,从 A20 高表达和表达抑制的正反两个方面,观察 A20 在细胞炎症应答中的意义及其潜在应用价值。结果证实,锌指蛋白 A20 表达可以明显降低 LPS 对人单核细胞的活化,减少细胞 TNF-α 的分泌,即 A20 表达可以下调细胞炎症反应。该结果从一个特定的角度解释了 A20 缺陷小鼠对 LPS 和 TNF-α 的敏感性异常增高的现象,进一步证实了锌指蛋白 A20 的抗炎作用,丰富了体内炎症的内源性调节机制,为 A20 相关生物制剂研究提供了理论依据。

参考文献:

[1] Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes[J]. Cell Signal, 2001, 13(2): 85-94.

[2] Dixit V M, Green S, Sarma V, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin[J]. J Biol Chem, 1990, 265(5): 2973-2978.

[3] Evans P C, Ovaa H, Hamon M, *et al*. Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation cell survival, has de-ubiquitinating activity[J]. Biochem J, 2004, 387(Pt 3): 727-734.

[4] 吴丽娟, 黎 燕, 胡美茹, 等. 改进 SDS-Phenol 法快速提取细胞总 RNA[J]. 第三军医大学学报,1999, 21(1): 57-59.

[5] 吴丽娟, 蒋建新, 朱佩芳, 等. 巴斯德毕赤酵母基因组外源基因整合数的高通量定量分析[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(7): 640-643.

[6] 熊建琼, 朱佩芳, 王正国, 等. 髓样分化蛋白 2 在内毒素/脂多糖激活人脐静脉内皮细胞中作用的实验研究[J]. 中华烧伤杂志, 2005, 21(2): 97-99.

[7] 吴丽娟, 刘素秀, 蒋建新, 等. 穿膜肽-人 A20 融合蛋白对单核细胞内毒素应答的影响[J]. 中华创伤杂志,2006, 22(1): 45-48.

[8] Freeman B D, Buchman T G. Coagulation inhibitors in the treatment of sepsis[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2002, 11(1): 69-74.

[9] Lee E G, Boone D L, Chai S, *et al*. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice[J]. Science, 2000, 289(5488): 2350-2354.

[10] Arvelo M B, Cooper J T, Longo C, *et al*. A20 protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide acute toxic lethal hepatitis[J]. Hepatoloy, 2002, 35(3): 535-543.

(编辑 陈聪连)