文章编号:1000-5404(2008)05-0367-03

论著

烧伤小鼠早期 P56 与 IFN mRNA 表达变化及麻醉或 KPV 对其表达的影响

李淑蓉[1],粟永萍[2],邓正阳[2],楼淑芬[2],程天民[2] ([1]成都医学院病理学教研室,成都 610083;[2]第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨小鼠烧伤早期干扰素诱导蛋白 P56、IFN-β、IFN-α mRNA 在肺、肝、脾、肾组织中的表达,以及烧伤后给予麻醉剂或 KPV 对其表达的影响。方法 选取健康昆明鼠 40 只,用随机排列表法分为 4 组:正常对照组、单纯烧伤组、烧伤 + KPV 组(简称 KPV 组)、烧伤 + 麻醉组(简称麻醉组),烧伤后 3 h 取肝、肺、肾、脾组织,提取 RNA,用两步法 RT-PCR 检测 P56、IFN-β、IFN-α mRNA 的表达。结果 P56 mRNA 在肝、脾、肺、肾组织中都有表达,且表达丰度较高。在肾组织中烧伤组和 KPV 组表达显著高于正常组($P<0.05$),麻醉组 P56 mRNA 表达与正常组相似;IFN-β mRNA 在肝组织中不表达,而在脾、肺、肾组织中均有表达,但表达量不高,在肺组织中烧伤组和麻醉组表达显著增加($P<0.05$),KPV 组表达略微降低;IFN-α mRNA 在所有已测脏器中都有表达,在肾组织中烧伤组和 KPV 组较正常组表达显著增加($P<0.05$),麻醉组增加不明显。结论 烧伤后干扰素表达增加,诱导 P56 表达增加,说明 P56 可能与早期创伤应激不良有关。

关键词:烧伤;干扰素诱导蛋白 P56;IFN-β;IFN-α
中图法分类号:R392.11;R394.2;R644 文献标识码:A

Expressions of P56, IFN-α and IFN-β mRNAs in major organs of severe burn mice and effects of KPV and anaesthesia

LI Shu-rong[1], SU Yong-ping[2], DENG Zheng-yang[2], LOU Shu-fen[2], CHENG Tian-min[2] ([1]Department of Pathology, Chengdu Medical College, Chengdu 610083; [2]State of Key Laborary of Trauma, Burn and Combined Injury, Department of Radiation Medicine, Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of P56, IFN-β, IFN-α mRNAs and the effects of KPV, a COOH-terminal tripeptide sequence of alpha-melanocyte stimulating hormone [alpha-MSH(11 – 13)], and anaesthesia on the expressions in severe burn injured mice. Methods Eighty mice were randomly and equally divided into 4 groups: control, burn (TBS15% Ⅱ), burn + KPV (injection of 40 μg per animal immediately after burn), and burn + anaesthesia (injection of 0.4 mg/kg diazepam and 10 mg/kg ketamine immediately after burn). All animals were sacrificed in 3 h after burn respectively. The expressions of P56, IFN-β, and IFN-α mRNAs in liver, spleen, lung and kidney tissues were detected with RT-PCR. Results P56 was expressed highly in liver, spleen, lung, and kidney in normal control group, and was obviously increased in kidney in burn group and burn + KPV group, but that in burn + anaesthesia group had no significant difference with that in normal control. IFN-β was not expressed in live and lightly expressed in spleen, lung and kidney, and its expression in lung was significantly increased in burn group and burn + anaesthesia group, but mildly decreased in burn + KPV group. IFN-α mRNA was expressed in all detected organs in normal control, and highly expressed in kidney of burn group and burn + KPV group, but not in burn + anaesthesia group. Conclusion These results indicate that the increased IFN expressing induce the up-regulation of P56, suggesting which may be involved in the disorder of early post trauma stress.

Key words: burn; interferon induced protein P56; IFN-β; IFN-α

实验研究表明,严重烫伤和烧伤早期糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)的转录激活能力减弱[1-3],反映出机体处于应激紊乱状态,该状态与严重创伤后早期全身性损害密切相关。麻醉(安定-氯胺酮)或注射 KPV(α-MSH 的 C 端三肽乙酰化异构体)后通过调节 GR 表达来对早期应激反应和炎症反应起到一个调节作用。而 GR 功能的一个重要机制可能是

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054201)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054201)
作者简介:李淑蓉,女,四川省广汉市人,博士,教授,主要从事神经损伤再生和分子病理方面的研究。电话:(028)68289163,E-mail:LSRSU1@yahoo.com.cn
通信作者:粟永萍,电话:(023)68752279,E-mail:suyping@yahoo.com
收稿日期:2007-05-24 修回日期:2007-11-10

GR-蛋白质的相互作用。我们以 GR 配体结合区为诱饵筛选到干扰素诱导蛋白 P56，并证明它与 GR 的相互作用关系[4,5]。为进一步了解 P56 的功能及其与麻醉和 KPV 的关系，本实验主要探讨 P56 在体内的表达状况或在重要的脏器中是否表达，与 P56 密切相关的干扰素（IFN-β、IFN-α）在小鼠严重创伤早期其 mRNA 的表达是否发生了改变，及创伤后给予麻醉剂或 KPV 对其表达的影响，为改善应激紊乱状态提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

健康昆明鼠 40 只，体质量 15～20g，雌雄不拘，由第三军医大学实验动物中心提供。40 只昆明鼠用随机排列表分为 4 组，每组 10 只：①正常对照组。②单纯烧伤组，于小鼠背部剪毛，用凝固汽油造成 15% 体表面积Ⅱ度烧伤。③烧伤 + KPV 组（简称 KPV 组），烧伤同单纯烧伤组，伤后立即注射 KPV，40 μg/只。④烧伤 + 麻醉组（简称麻醉组），烧伤同单纯烧伤组，伤后立即注射安定（0.4 mg/kg）、氯氨酮（10 mg/kg）。除正常对照组外，其余 3 组分别于烧伤后 3 h 取肝、肺、肾、脾组织。

1.2 试剂

DEPC 为 Sigma 公司产品，Tripure 试剂盒购自 Roche 公司，RNA PCR Kit（AMV）Ver.2.1 为大连 TaKaRa 产品，KPV 合成肽由第三军医大学免疫学研究所合成。

1.3 RNA 的提取

取肝、肺、肾、脾组织 100 mg，按 Tripure 试剂盒说明书操作，其吸光度比值[$D(260)/D(280)$]范围：1.6～2.0。

1.4 RT-PCR

1.4.1 PCR 引物设计与合成 从 GenBank 中获得小鼠 P56、IFN-β、IFN-α 的 cDNA 序列，应用 Primer Premier 5.0 设计引物。引物序列如下：P56（580 bp）：上游 5′-GCTACCACCTTTACAG-CAACCAT-3′，下游 5′-AATCTTGGCGATAGGCTACGACT-3′；IFN-β（273 bp）：上游 5′-AGCACTGGGTGGAATGAGACTAT-3′，下游 5′-TCAGTTTTGGAAGTTTCTGGTAA-3′；IFN-α（533 bp）：上游 5′-CAACCTCTGCAAGACCCACAATG-3′，下游 5′-GACTTCT-GCTCTGACCACCTCCC-3′。

1.4.2 两步法 RT-PCR 反应 按试剂盒操作说明进行，第 1 步逆转录反应条件：30 ℃ 10 min，42 ℃ 30 min，99 ℃ 5 min，5 ℃ 5 min，共 1 次循环；第 2 步 PCR 扩增循环条件：94 ℃ 2 min，94 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，35 个循环后 72 ℃ 延伸 5 min。取 RT-PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳，用凝胶成像系统扫描观察。以 β-actin（246 bp）作内参，比较目的条带的相对密度。

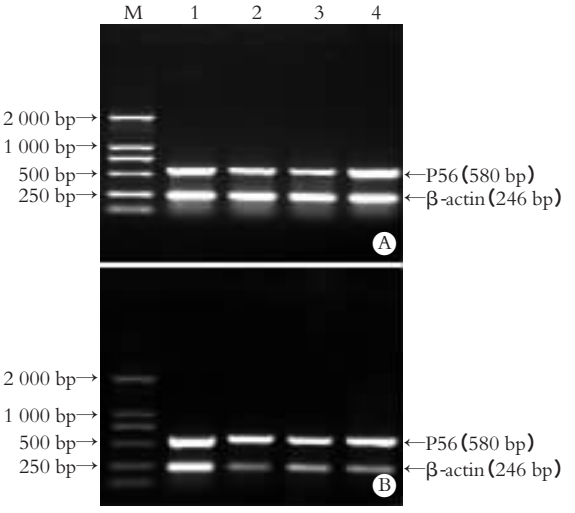
1.5 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间均数比较采用 SPSS 10.0 统计学软件进行方差分析。

2 结果

2.1 P56 mRNA 表达

肝组织：P56 mRNA 高表达，烧伤组和 KPV 组表达较正常组轻微降低，麻醉组与正常相似（图 1A）；脾组织：烧伤组和 KPV 组 P56 mRNA 表达较正常组显著增加（$P<0.05$），麻醉组与正常组表达相似；肺组织和肾组织 P56 mRNA 表达与脾组织相同（图 1B，表 1）。



A：肝组织；B：肾组织

M：DNA 标准（DL 2000）；1：正常组；2：烧伤组；3：KPV 组；4：麻醉组

图 1 肝、肾组织中 P56 mRNA 的表达

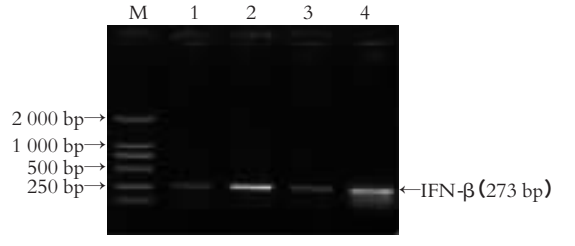
表 1 烧伤小鼠肾组织中 P56、IFN-α mRNA 和肺组织中 IFN-β mRNA 的表达（$n=10$，$\bar{x} \pm s$）

组别	肾组织		肺组织
	P56 mRNA	IFN-α mRNA	IFN-β mRNA
正常组	1.024 ± 0.021	0.482 ± 0.005	0.526 ± 0.008
烧伤组	1.213 ± 0.018[a]	0.654 ± 0.007[a]	0.819 ± 0.005[a]
KPV 组	1.186 ± 0.012[a]	0.885 ± 0.004[a]	0.465 ± 0.009
麻醉组	1.011 ± 0.016	0.426 ± 0.009	0.763 ± 0.007[a]

a：$P<0.05$，与正常组比较

2.2 IFN-β mRNA 表达

肝组织：IFN-β mRNA 不表达；脾组织：烧伤组表达较正常组轻微降低，KPV 组和麻醉组表达明显降低；肺组织：烧伤组和麻醉组较正常组 IFN-β mRNA 表达显著增加（$P<0.05$），KPV 组略微降低（图 2）；肾组织 IFN-β mRNA 在烧伤组和 KPV 组表达增加，麻醉组与正常组表达相似。IFN-β mRNA 在已检测组织中表达量均不高。



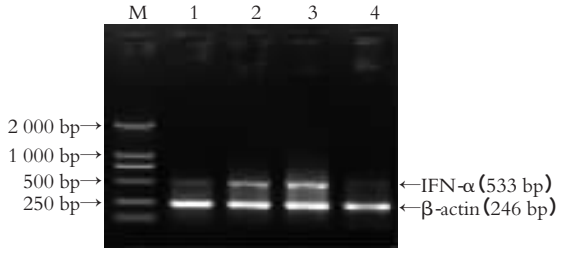
M：DNA 标准（DL 2000）；1：正常组；2：烧伤组；3：KPV 组；4：麻醉组

图 2 肺组织中 IFN-β mRNA 的表达

2.3 IFN-α mRNA 表达

肝组织：IFN-α mRNA 在 4 组都表达，KPV 组较其余 3 组表达略增加；脾组织：烧伤组较正常组 IFN-α mRNA 表达增加，KPV 组和麻醉组 IFN-α mRNA 表达降低；肺组织：IFN-α mRNA 高表达，烧伤组、KPV 组、麻醉组都较正常组表达增加，麻醉组

增加略低一些；肾组织：烧伤组和 KPV 组较正常组 IFN-α mRNA 表达明显增加（$P<0.05$），麻醉组与正常组表达相似（图 3）。



M：DNA 标准（DL 2000）；1：正常组；2：烧伤组；3：KPV 组；4：麻醉组

图 3　肾组织中 IFN-α mRNA 的表达

3　讨论

应激反应是严重创伤后机体的首发反应，糖皮质激素（glucocorticoid，GC）效应是机体最为重要的应激反应之一，其中糖皮质激素受体（GR）是 GC 效应发挥的关键环节。GR 抑制炎性细胞因子的生成与释放。本室前期研究表明烫伤后 30 min 肝脏 GR 的表达即开始降低，4 h 左右达最低值，之后逐渐上升。伤后早期血清皮质酮浓度显著升高，2～4 h 达高峰，之后逐渐回落。而麻醉剂（安定-氯胺酮）对烧伤后皮质酮的明显升高有抑制作用，能显著降低烧伤后炎性细胞因子水平[5]，可抑制 GR 表达的下调。促黑色素细胞刺激素（α-MSH）及其 C 端三肽乙酰化异构体 KPV 均可减缓重度烫伤引起的高细胞因子血症和高皮质酮血症，升高肝组织 GR 表观结合容量，改善严重创伤对肝、肾功能的损害[6]。本实验以 GR 为诱饵筛选到 GR 相互作用蛋白-干扰素诱导蛋白 P56，观察到了 P56 mRNA 的表达及它与麻醉剂和 KPV 的关系。

干扰素作为重要的细胞因子，是一类能发挥抗病毒、抗肿瘤、调节免疫功能的蛋白质。干扰素的多种作用是由干扰素诱导合成的多种蛋白介导的。大多数干扰素诱导蛋白人们尚不知其特殊的生化和细胞功能。P56 是人体细胞经干扰素（IFN）处理后诱导的最为丰富的蛋白质。P56 存在时，体内外的蛋白合成被抑制。过去有关 P56 的研究主要存在于细胞培养体系中，加干扰素后诱导 P56 mRNA 和蛋白表达，静息细胞（未加干扰素）不表达 P56 mRNA 和蛋白[7-9]。有关 P56 在体内脏器中是否表达、表达量的高低及分布状况少见报道。本实验结果表明多种重要脏器都表达 P56 mRNA，表达丰度较高，说明体内存在一定量的干扰素，能诱导 P56 mRNA 的表达；P56 mRNA 高丰度的分布于已检测的所有脏器中，推测它可能行使重要的功能。同时，烧伤早期主要脏器 P56 mRNA 表达升高，升高的 P56 可能降低 GR 的活性，使炎性介质分泌增加，导致过度炎症反应的发生，说明 P56 参与了烧伤早期的应激反应。麻醉后 P56 mRNA 表达与正常组相似，再次验证了麻醉对机体的保护作用，P56 也参与了这一机制。

IFN-β mRNA 在肝组织中不表达，而在脾、肺和肾组织中表达，但表达量不高，烧伤组表达比正常组略增加。IFN-α mRNA 在所有已测脏器中都表达，烧伤组较正常组表达增高，麻醉组增加不明显或与正常组相似。我们推测烧伤后干扰素表达增加，诱导 P56 表达增加，这与 P56 mRNA 烧伤后表达增加结果一致，再次说明 P56 与早期创伤应激不良有关。麻醉后 P56、IFN mRNA 表达与正常组相似，说明 P56、IFN 参与了麻醉对早期应激的调控。进一步研究 P56 在创伤后的功能，可为防治创伤早期应激紊乱提供新的措施。

体内注射 KPV 可缓解严重创伤所致的高细胞因子血症和高皮质酮血症，升高肝组织 GR 表观结合容量，改善严重创伤对肝、肾功能的损害[9]。本研究观察到注射 KPV 后 P56、IFN mRNA 表达无明显改变，表明 KPV 可能通过其他途径参与了创伤早期的应激反应。

参考文献：

[1] Liu D H，Su Y P，Zhang W，*et al*. Changes in glucocorticoid and mineralocorticoid receptors of liver and kidney cytosols after pathologic stress and its regulation in rats[J]. Crit Care Med，2002，30(3)：623－627.

[2] Liu D H，Su Y P，Zhang W，*et al*. Downregulation of glucocorticoid receptors of liver cytosols and the role of the inflammatory cytokines in pathological stress in scalded rats[J]. Burns，2002，28(4)：315－320.

[3] 王军平，粟永萍，赵景宏，等. 严重烫伤大鼠肝组织核蛋白中糖皮质激素受体表达的变化及地塞米松对其的影响[J]. 中华创伤杂志，2002，18(4)：210－213.

[4] 李淑蓉，粟永萍，刘晓宏，等. 干扰素诱导蛋白 P56 与糖皮质激素受体的相互作用及对其转录活性的影响[J]. 生物化学与生物物理进展，2004，31(9)：791－795.

[5] Kawasaki C，Kawasaki T，Ogata M，*et al*. Ketamine isomers suppress superantigen-induced proinflammatory cytokine production in human whole blood[J]. Can J Anaesth，2001，48(8)：819－823.

[6] Hiltz M E，Catania A，Lipton J M. Anti-inflammatory activity of alpha-MSH（11－13）analogs：influences of alteration in stereochemistry[J]. Peptides，1991，12(4)：767－771.

[7] Wathelet M，Moutschen S，Defilippi P，*et al*. Molecular cloning，full-length sequence and preliminary characterization of a 56-kDa protein induced by human interferons[J]. Eur J Biochem，1986，155(1)：11－17.

[8] Der S D，Zhou A，Williams B R，*et al*. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha，beta，or gamma using oligonucleotide arrays[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1998，95(26)：15623－15628.

[9] Guo J，Peters K L，Sen G C. Induction of the human protein P56 by interferon，double-stranded RNA，or virus infection[J]. Virology，2000，267(2)：209－219.

（编辑　薛国文）