文章编号:1000-5404(2009)21-2065-04

论著

人肝再生增强因子对体外单个核细胞 PKCα-NF-κB 及 IL-2 的影响

王新国,刘 杞,孙 航 (重庆医科大学第二附属医院感染科,病毒性肝炎研究所,教育部感染性疾病分子生物学重点实验室,重庆 400010)

摘 要:目的 观察人肝再生增强因子(human augmenter of liver regeneration,hALR)对人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)PKCα-NF-κB 及 IL-2 的影响,探讨 hALR 免疫抑制机制。**方法** 用梯度离心法分离正常人 PBMC,分成正常对照组、刀豆蛋白 A(ConA)刺激组(ConA 组)和 hALR 干预组(ConA + hALR 组)。ConA 组用 5 μg/ml ConA 刺激细胞增殖和分泌细胞因子 IL-2;ConA + hALR 组用 30 μg/ml hALR 对 ConA 刺激进行干预。于细胞培养 0、8、16、32、40 h 时,用 MTT 法测定细胞增殖程度,Weston blot 检测细胞内信号通路 PKCα-NF-κB 表达含量,Fluo-3AM 装载检测胞内钙离子浓度,用双抗夹心酶联法检测上清细胞因子 IL-2 含量。**结果** ConA 组细胞增殖逐渐加强,16 h 时与正常对照组比较具有统计学意义($P < 0.05$);PKCα、NF-κB 表达上调及上清 IL-2 含量增加趋势一致,在 16 h 达到高峰($P < 0.05$)。ConA + hALR 组细胞没有增殖,PKCα-NF-κB 表达及上清 IL-2 含量最高峰后移至 32 h。每个时间点各组细胞内 Ca^{2+} 浓度没有差别。**结论** hALR 可能通过抑制 PKCα-NF-κB 通路阻碍 IL-2 的产生速度进而抑制免疫。

关键词: 人肝再生增强因子;外周血单个核细胞;PKCα-NF-κB;IL-2
中图法分类号: R341; R392-33; R392.11 **文献标识码:** A

Effects of human augmenter of liver regeneration on PKCα-NF-κB expressions and IL-2 secretion in peripheral mononuclear cells

WANG Xin-guo, LIU Qi, SUN Hang (Department of Infectious Diseases, Institute of Viral Hepatitis, Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases of Ministry of Education, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To observe the effects of human Augmenter of liver regeneration (hALR) on the expressions of PKCα, NF-κB and IL-2 in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and to evaluate the immunosuppressive mechanism of hALR. **Methods** PBMCs were isolated from healthy volunteers by gradient centrifugation and were divided into normal control group (N), ConA stimulated group (ConA group) and hALR interfering group (ConA + hALR group). Cells in the ConA group were stimulated by ConA (5 μg/ml) to proliferate and to secret IL-2. ConA + hALR group was interfered by hALR at the dose of 30 μg/ml. After cells were cultured for 0, 8, 16, 32 and 40 h, the cell proliferation was detected by MTT assay. The expressions of PKCα and NF-κB were detected by Western blot analysis. The concentration of intracellular calcium was determined according to uploading of probe Fluo-3AM. The concentration of IL-2 in the supernatants was detected by ELISA method. **Results** Cells in the ConA group proliferated gradually and peaked at 16 h with statistical significance as compared with cells in normal control group ($P < 0.05$). The expressions of PKCα and NF-κB in the PBMC were upregulated, which was concordant with the increase of IL-2 in the supernatant, and peaked at 16 h ($P < 0.05$). Cell proliferation in hALR interfering group was not observed and the peak of PKCα, NF-κB and IL-2 were postponed from 16 h to 32 h. There was no significant difference of intracellular calcium between the 2 groups at these time points. **Conclusion** hALR may inhibit the secretion of IL-2 by suppressing the pathway of PKCα-NF-κB and thus results in inhibition of immune response.

Key words: human augmenter of liver regeneration; peripheral blood mononuclear cells; PKCα-NF-κB; IL-2

基金项目: 国家自然科学基金(30570826);重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5228)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30570826) and the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2008BB5228)
作者简介: 王新国,男,山东省临沭县人,博士,主治医师,主要从事肝脏疾病和免疫调节方面的研究。E-mail:wxg2035@yahoo.com.cn
通信作者: 刘 杞,E-mail: liuqiz@hotmail.com
收稿日期: 2009-04-21;**修回日期:** 2009-04-30

人肝再生增强因子(human augmenter of liver regeneration,hALR)是活化肝细胞表达和分泌的小分子蛋白,在肝脏的再生、肝癌和肝炎的发展过程中起重要作用,主要促进肝癌的发生和发展、肝炎的恢复和调节肝脏的免疫。前期我们发现 ALR 有抑制免疫排斥、提高移植肝细胞的成活率、改善重型肝炎病情和抑制抗-HB_S产生等功能[1-3],其机制与抑制 IL-2 有关[4]。IL-2 是在 PKCα 的调控下,激活 NF-κB 而表达的细胞因子[5]。本研究旨在通过体外实验观察 ALR 对人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)内 PKCα-NF-κB 表达及 IL-2 分泌的影响,以期探讨 ALR 免疫抑制机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

刀豆蛋白 A(ConA)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、D-Hanks(Sigma 公司),RPMI1640 培养液(Gibco 公司),新生牛血清(浙江四季青生物有限公司),人淋巴细胞分离液(天津 TBD 公司),hALR 由本研究所自制。PKCα 和 NF-κB 小鼠抗人单克隆抗体(Santa Cruz 公司),辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司),小鼠抗人 β-actin 单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),人 IL-2 ELISA 试剂盒(北京晶美生物工程有限公司),Fluo-3 AM(钙离子荧光探针,碧云天生物技术研究所)。

1.2 单个核细胞分离和刺激实验

抽取健康者空腹静脉血,肝素抗凝;用淋巴细胞分离液,梯度离心,吸取单核细胞层,D-Hanks 洗涤 2 次后,RPMI1640 重悬,按照单个核细胞以 5×10^5/孔种入 96 孔细胞培养板。接种细胞分正常对照组、ConA 刺激组(ConA 组)和 hALR 干预组(ConA + hALR 组),每组设 3 个复孔。正常对照组为细胞直接培养,不加干扰因素;ConA 组指用终浓度为 5 μg/ml ConA 刺激细胞增殖和 IL-2 分泌;ConA + hALR 组用终浓度为 30 μg/ml hALR 干预 ConA 的刺激。所有培养孔用含 10% 小牛血清 RPMI1640 培养液定容至 200 μl。于培养 0、8、16、32、40 h 时,用 MTT 法测定细胞增殖,具体方法参照文献[6]稍作改动,即于以上时间点每孔加入 15 μl MTT 溶液(5 mg/ml),继续培养 4 h。离心(1 000 r/min,10 min),小心吸掉上清,每孔加 100 μl 含 0.04 mol/L HCl 的 10% 十二烷基磺酸钠(SDS),吹打均匀。在酶联免疫检测仪波长 595 nm(630 nm 校准)测量各孔的吸光值。于以上各个时间点离心(5 000 r/min,5 min)收集细胞和上清,冻存 -20 ℃ 用于检测 IL-2 和 PKCα、NF-κB。

1.3 IL-2 检测

取出冻存上清至室温,用 ELISA 试剂盒所带的样本稀释液按 1:2(体积比)稀释。除空白孔之外,分别将不同浓度标准品和标本按照 100 μl/孔加入相应孔中,每个标本设 3 个复孔,用封板胶纸封住反应孔,37 ℃孵育 90 min,洗板 4 次。除空白,加生物素化的 IL-2 一抗工作液 100 μl/孔,封孔,37 ℃孵育 60 min,洗板 4 次。加酶结合物工作液 100 μl/孔,37 ℃孵育 30 min,洗板 4 次。加显色剂 100 μl/孔,37 ℃孵育 15 min,再加终止液 100 μl/孔,混匀,立即用酶标仪测量 D(450)值。读出数值,做出标准曲线,求出浓度。

1.4 Western blot 检测 PKCα、NF-κB 变化

蛋白的准备:用 100 μl 蛋白上样 Buffer + 50 mmol/L NaF 初步裂解,超声进一步破碎细胞(200 W,5 s × 3 次),煮沸 5 min,冰上冷却。30 μl 上样,15% SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜(PVDF)。5% BSA 封闭 1 h; TTBS 洗涤 5 min × 3 次,加入以 1∶1 000 稀释于 5% BSA 中的 PKCα 和 NF-κB 一抗 10 ml,于 4 ℃ 摇床上平缓摇动过夜。取出塑料袋中的 PVDF 膜,以适量的 TTBS 洗涤 3 次,每次 5 min,将 PVDF 膜放入另一塑料袋中,加入以 1∶2 000 稀释于封闭液中的 HRP 标记的兔抗鼠 IgG 10 ml,于室温摇床上平缓摇动 1 h;取出 PVDF 膜,用 TTBS 洗涤 3 次,每次 5 min。ECL 曝光显影,用 Quality One 4.62 图像分析软件分析 PKCα 和 NF-κB 灰度值,用 β-actin 灰度值平衡,β-actin 检测步骤同上。每组 3 个平行孔均做以上指标。

1.5 胞内游离 Ca^{2+} 浓度($[Ca^{2+}]_i$)的测定

按经典方法,以钙离子敏感的荧光探针 Fluo-3 AM 检测细胞内$[Ca^{2+}]_i$。在细胞培养不同时间加 Fluo-3 AM 5 μmol/L,37 ℃ 孵育 1 h,PBS 洗涤 1 次,室温 30 min,上机检测,激发波长 488 nm,发射波长 526 nm。

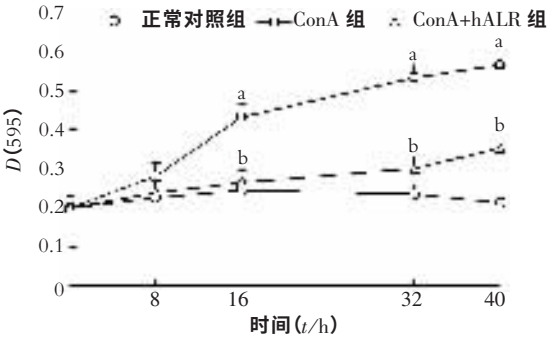
1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 MTT 结果

ConA 刺激单个核细胞增殖逐渐增强,ALR 抑制细胞增殖(图 1)。



a:$P<0.05$,与正常对照组比较; b:$P<0.05$, 与 ConA 组比较

图 1 各组细胞增殖分析

2.2 各组细胞因子含量动态变化

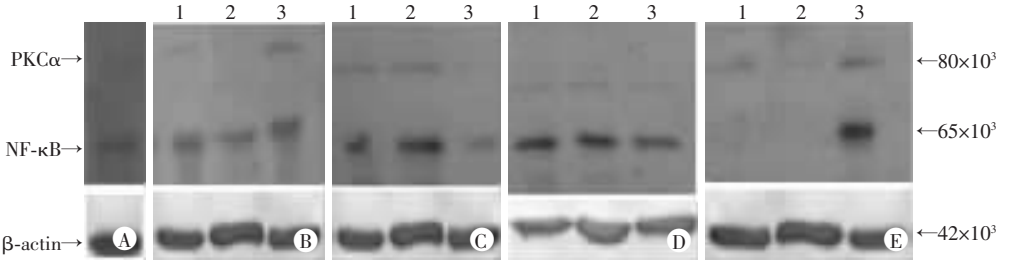
在各组细胞上清液中,ConA 组 IL-2 含量最高点在 16 h(15.48 pg/ml, $P<0.05$),ConA + hALR 组最高点在 32 h(14.97 pg/ml),明显滞后于 ConA 组。见图 2。

2.3 各组 PKCα 表达变化

在各组细胞中,ConA 组 PKCα 表达最高点在 16 h($P<0.05$),ConA + hALR 组表达最高点在 32 h。ConA + hALR 组 PKCα 在 16 h 明显低于 ConA 组($P<0.01$)。见图 3。

2.4 各组细胞内 NF-κB 的变化

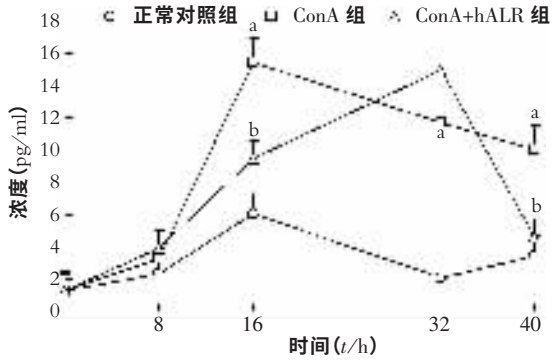
ConA 组 NF-κB 表达最高点在 16 h($P<0.05$),ConA + hALR 组最高点在 32 h。ConA + hALR 组 NF-κB 在 16 h 显著低于 ConA 组($P<0.01$)。见图 3。



1：正常对照组；2：ConA 组；3：ConA + hALR 组

A：0 h；B：8 h；C：16 h；D：32 h；E：40 h

图 3　Western blot 检测各组细胞不同时间点 PKCα 和 NF-κB 表达



a：$P<0.05$，与正常对照组比较；b：$P<0.05$，与 ConA 组比较

图 2　各组细胞上清中 IL-2 含量分析

2.5　各组细胞内 Ca^{2+} 的变化

各组细胞内钙离子均先下降后回升，其中 ConA 组下降最快，在 16 h 达到最低点，其次为正常对照组和 ConA + hALR 组，最终达到相似程度。各组在每个时间点均没有统计学差异。见图 4。

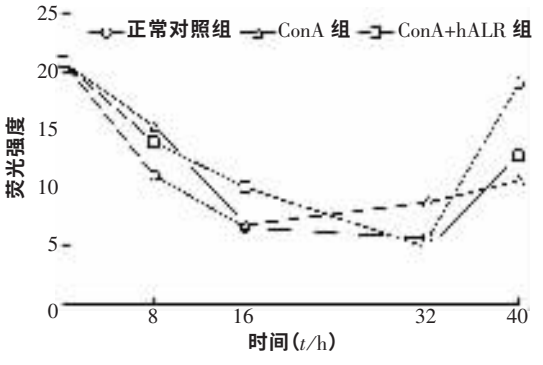


图 4　各组细胞内 Ca^{2+} 探针荧光强度

3　讨论

我们在前期的研究中观察到 ALR 能够抑制移植肝细胞周围的炎症细胞浸润，提高移植肝细胞的成活率，提示 ALR 是一种免疫排斥抑制剂[2,3]，进一步研究发现其与 IL-2 的产生有关[4]。白介素-2(IL-2)主要由活化的 T 淋巴细胞产生，并以自分泌方式维持自身存活和增殖的细胞因子[7,8]。临床常用 IL-2 提高 T 淋巴细胞活力来治疗肿瘤[9]，用 CsA、FK506 等抑制 IL-2 的产生来抑制移植排斥反应[10]。

蛋白激酶 C 是一种细胞质酶，根据种属和功能分成 12 亚型和 3 类：钙依赖型或经典型 PKC（α，βⅠ，βⅡ，γ）、钙不敏感型或新型 PKC（δ，ε，η，θ，μ）和非典型 PKC（ζ，λ，ι）[11]。在未受刺激的细胞中，PKCα 主要分布在细胞质中，呈非活性构象。一旦有 Ca^{2+} 的存在，PKCα 将激活成有活性的酶，参与细胞质生化反应的调控，同时也作用于细胞核转录因子，参与基因表达的调控，其中最主要的就是调节 NF-κB 活性，形成了 PKCα-NF-κB 信号通路[12]。细胞内 Ca^{2+} 也促使 PKCα 降解[13]，ALR 可以影响细胞内 Ca^{2+}，因此本实验测定细胞内 Ca^{2+}，以期了解 ALR 是否也经过细胞内 Ca^{2+} 影响 PKCα 的含量。结果发现各组之间胞内 Ca^{2+} 浓度没有明显差异，提示 ALR 可能不通过 Ca^{2+} 调节 PKCα 的含量，当然这也可能与我们观察的时间点及细胞内 Ca^{2+} 的自我调节有关。

本实验中，PKCα-NF-κB 及 IL-2 在 ConA 的刺激下表达逐渐增加，16 h 达高峰后下降。hALR 在 16 h 明显抑制 IL-2 的产生，这与我们以前观察的结果趋势基本一致，再次证实了 hALR 具有抑制 IL-2 产生的功能，也提示了通过抑制 PKCα-NF-κB 通路实现的[14]。为了进一步观察 hALR 抑制的时间性，本实验调整了观察时间，结果发现 hALR 不是持续的抑制 IL-2 产生，而是推迟了 IL-2 的峰值，hALR 可能通过延迟细胞内通路活化而影响细胞分泌 IL-2。免疫细胞活化之后，也激活抑制机制以防止细胞过度活化，如激活性受体 ITAM 与抑制性受体 ITIM 共同调节细胞活化，使得免疫应答得以保持在适度的时空范畴内。本实验中，hALR 推迟 IL-2 的峰值，可能导致抑制机制加强，后者加速 IL-2 的降解或加强抑制 IL-2 生成以致降至正常之下，至于具体抑制机制目前还不明确。

本研究还发现，ConA 增殖细胞的过程中，促进了 PKCα 表达，变化趋势与 IL-2 一致。hALR 则抑制 ConA 对 PKCα 的表达，使之推迟，趋势亦与抑制 IL-2 一致，初步提示了 hALR 通过抑制 PKCα 而抑制 IL-2。文献[15]报道 PKCα 是免疫细胞增殖和 IL-2 产生的重要信号分子，却与 ConA 刺激无关。这可能与观察时间点有关，他们观察点为 48 ~ 72 h，根据我们的结果

看,40 h IL-2和PKCα均表现迅速下降趋势,所以48~72 h有可能没有差异,故实验提示了PKCα介导ConA的免疫刺激功能。另一方面,hALR抑制PKCα的同时也抑制了细胞增殖,这与PK155抑制细胞增殖机制一致[16],因此进一步确定了PKCα的作用和hALR的作用机制。

参考文献:

[1] 石小枫,孙 航,唐 琳,等. 肝再生增强因子对外原性抗原引起机体免疫应答影响的研究[J]. 免疫学杂志,2007,23(6):606-609.

[2] 张 艳,王志毅,石小枫,等. 同种肝细胞移植细胞排斥反应机理及肝再生增强因子的作用[J]. 免疫学杂志,2007,23(6):668-671.

[3] 王志毅,张 艳,石小枫,等. 肝细胞移植联合肝再生增强因子治疗大鼠急性肝功能衰竭的研究[J]. 第三军医大学学报,2007,29(10):899-902.

[4] 谢 华,孙 航,郭 辉,等. 肝再生增强因子对大鼠脾单个核细胞增殖及IL-2产生能力的影响[J]. 中国免疫学杂志,2007,23(5):467-470.

[5] Trushin S A, Pennington K N, Carmona E M, *et al*. Protein kinase Calpha (PKCalpha) acts upstream of PKCtheta to activate IkappaB kinase and NF-kappaB in T lymphocytes[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(19):7068-7081.

[6] 刘 民,马 华,李柏青. MTT法检测小鼠淋巴细胞增殖性反应探讨[J]. 中国实验动物学杂志,1999,9(3):146-149.

[7] Sprent J. Burnet oration. T-cell survival and the role of cytokines[J]. Immunol Cell Biol, 2001, 79(3):199-206.

[8] Smith K A. Interleukin-2: inception, impact, and implications[J]. Science, 1988, 240(4856):1169-1176.

[9] Den-Otter W, Jacobs J J, Battermann J J, *et al*. Local therapy of cancer with free IL-2[J]. Cancer Immunol Immunother, 2008, 57(7):931-950.

[10] Brunet M, Crespo M, Millan O, *et al*. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in renal transplant recipients under treatment with cyclosporine and Myfortic[J]. Transplant Proc, 2007, 39(7):2160-2162.

[11] Webb B L, Hirst S J, Giembycz M A. Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis[J]. Br J Pharmacol, 2000, 130(7):1433-1452.

[12] 谭余庆,张永祥. 蛋白激酶C和IκB/NF-κB在免疫调节中的作用[J]. 免疫学杂志,2000,16(6):464-467.

[13] Shea T B, Beermann M L, Griffin W R, *et al*. Degradation of protein kinase C alpha and its free catalytic subunit, protein kinase M, in intact human neuroblastoma cells and under cell-free conditions. Evidence that PKM is degraded by mM calpain-mediated proteolysis at a faster rate than PKC[J]. FEBS Lett, 1994, 350(2-3):223-229.

[14] Hwang E S, Hong J H, Glimcher L H. IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508[J]. J Exp Med, 2005, 202(9):1289-1300.

[15] Iwamoto T, Hagiwara M, Hidaka H, *et al*. Accelerated proliferation and interleukin-2 production of thymocytes by stimulation of soluble anti-CD3 monoclonal antibody in transgenic mice carrying a rabbit protein kinase C alpha[J]. J Biol Chem, 1992, 267(26):18644-18648.

[16] Selvatici R, Falzarano S, Franceschetti L, *et al*. Effects of PKI55 protein, an endogenous protein kinase C modulator, on specific PKC isoforms activity and on human T cells proliferation[J]. Arch Biochem Biophys, 2007, 462(1):74-82.

(编辑 吴培红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)21-2068-01

乳腺多发性海绵状血管瘤影像学表现1例

朱明霞[1],欧阳羽[1],杨红燕[2] ([1]重庆医科大学附属第一医院放射科,重庆 400016;[2]重庆市丰都县中医院放射科,重庆 丰都 408200)

1 资料与方法

患者,女,58岁。发现左乳包块5年,伴隐痛。查体:左乳内上象限扪及2个包块,位置靠上者大小约1.5 cm×1.5 cm,质偏硬,边界较清,与周围黏连,位置靠下者大小约3.0 cm×4.0 cm,质韧,边界欠清。局部皮肤无发红、发热,无溃烂,无桔皮样改变,不伴乳头溢液及乳头凹陷。右乳未见异常。双侧腋窝及锁骨上下区未扪及肿大淋巴结。入院诊断:左乳癌或左乳纤维腺瘤。

钼靶摄影:左乳内上象限见多枚最大径0.6~1.0 cm的小结节,边界较清楚,周围结构紊乱,其中两枚内见弯曲的线状钙化,部分结节有聚集改变(图1)。诊断意见:左乳内上多发小结节,考虑良性病变。超声检查:左乳皮下脂肪层内见一约1.1 cm×0.7 cm的低回声,位于内上象限,边界可见,形态欠规则,彩色多普勒检查其内未见血流信号(图2)。

手术及病理:取左乳内上象限放射状切口,见一约1.5 cm的结节样团块,其乳腺组织与胸大肌之间有结节状块数枚,直径:0.4~1.0 cm,切除病灶。病理:(左乳)海绵状血管瘤伴小灶性骨化。

(下转2077页)

作者简介:朱明霞,女,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事乳腺影像学方面的研究。E-mail:zmx0307@sina.com

通信作者:欧阳羽,电话:(023)89012244

收稿日期:2009-03-12;修回日期:2009-04-01