文章编号:1000-5404(2010)05-0435-04

论著

锌指蛋白A20突变体转基因小鼠脓毒症肺损伤的研究

吴丽娟[1],陈 潇[1],冯建男[2],但 刚[1],龚杨彬[1],曾 平[1] (610083 成都,成都军区总医院检验科[1];100850 北京,军事医学科学院基础医学研究所第四研究室[2])

[摘要] **目的** 了解锌指蛋白A20突变体(A20△)转基因小鼠脓毒症肺损伤的特点,探讨A20△对小鼠脓毒症肺损伤的影响。**方法** 以A20△转基因脓毒症小鼠为动物模型(A20△转基因组),采用流式细胞仪测定肺组织单核巨噬细胞浸润,ELISA测定肺组织A20△、TNF-α、IL-1β水平,结合肺体指数和病理检查对炎症及其损伤程度进行鉴定。实验同时设LPS对照组(LPS组)和生理盐水对照组(对照组)。**结果** 给予LPS后6、12、24 h,A20△转基因组小鼠肺体指数较LPS组明显下降($P<0.01$,$P<0.05$);A20△转基因组小鼠肺组织浸润单核/巨噬细胞数较LPS组明显下降($P<0.01$)。给予LPS后3、6 h,A20△转基因组小鼠肺组织炎症细胞因子TNF-α水平较LPS组明显下降($P<0.01$);IL-1β水平也较LPS组明显下降($P<0.05$,$P<0.01$);给予LPS后12、24 h,TNF-α和IL-1β水平差异无统计学意义($P>0.05$)。病理学观察表明A20△转基因组小鼠肺组织充血程度、肺泡积液及肺间质增厚程度均较LPS组轻。**结论** A20△转基因小鼠在一定程度上具有抵御LPS诱导性肺损伤的能力,其机制可能是通过抑制单核细胞向肺组织浸润和降低肺内炎症细胞因子水平实现的。

[关键词] 脓毒症;肺;创伤和损伤;锌指蛋白;小鼠,转基因
[中图法分类号] R631;R322.35;R446.6 **[文献标志码]** A

Pneumonic injuries of Zinc finger protein A20 mutant transgenic mice with experimental sepsis

Wu Lijuan[1], Chen Xiao[1], Feng Jiannan[2], Dan Gang[1], Gong Yangbin[1], Zeng Ping[1] ([1] Department of Clinical Laboratories, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083; [2] Department 4, Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100850, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the pneumonic injury features of zinc finger protein A20 mutant (A20△) transgenic mice with experimental sepsis, and approach the regulation roles of A20△ and underlying mechanism. **Methods** Totally 72 Kunming mice were randomly divided into 3 groups, control, LPS group and A20△ transgene group. The mice of the control group received an injection of 1.6 ml normal saline through tail vein, those from the LPS group underwent an injection of 1.6 ml normal saline and then 2.5 mg/kg LPS in 8 h later, while those in A20△ transgene group were injected with 10 μg/1.6 ml plasmid pCAGGS-A20△ followed by an injection of 2.5 mg/kg LPS in 8 h after the first injection. The mice were killed in 3, 6, 12 and 24 h after LPS injection and their lungs were resected. The quantity of mononuclear macrophage infiltrating in the lung was detected by flow cytometry. The levels of A20 mutant, TNF-α and IL-1β were analyzed by ELISA. The lung-body index and pathologic examination were recruited to accredit lung injury. **Results** In A20△ transgene group, the lung-body indexes were decreased obviously than that of LPS Group in 6, 12 and 24 h after LPS injection ($P<0.05$, 0.01). The amount of mononuclear macrophage infiltrating in the lung were decreased obviously than that of LPS group ($P<0.01$). In 3 and 6 h after injection LPS, the levels of TNF-α in pneumonic tissue were decreased obviously than that of LPS group ($P<0.01$). The levels of IL-1β in pneumonic tissue were also decreased obviously than that of LPS group ($P<0.05$, 0.01). After injection of LPS for 12 and 24 h, there were no difference in the levels of TNF-α and IL-1β in A20△ transgene group and LPS group ($P>0.05$). The results of pathologic examination indicated that the pneumonic injury of A20△ transgene group was milder than LPS Group. **Conclusion** A20△ transgenic mice withstands the pneumonic

[基金项目] 全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MA189)
[通信作者] 吴丽娟,电话:(028)86571054,E-mail:wulijuan1638@126.com

inflammatory damages in LPS-induced sepsis at some extent, and the mechanism may be through suppressing the infiltration of monocytes to pneumonic tissue as well as decreasing the levels of inflammatory cytokines.

[Key words] sepsis; lung; wounds and injuries; zinc finger protein; mice, transgenic

Supported by the General Program of "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06MA189). Corresponding author: Wu Lijuan, Tel: 86-28-86571054, E-mail: wulijuan1638@126.com

脓毒症是临床严重创伤、烧伤、大手术等常见并发症。患者体内炎症反应过度,出现全身性炎症反应综合征(system inflammatory response syndrome,SIRS),甚至诱发多器官功能衰竭,是临床患者死亡的重要原因之一[1]。脓毒症时体内脏器炎症损伤以肺脏较为突出,因此,本研究以脓毒症肺损伤为观察靶点,研究内源性重要炎症调控蛋白——锌指蛋白A20(zinc finger protein A20,A20)对体内过度炎症反应的调节,以期掌握内源性炎症调控机制,发掘可能干预临床过度炎症的新方法。

本课题组前期研究[2]中,以A20基因沉默载体和A20过表达载体转染人单核细胞THP1细胞株,观察THP1对LPS应答的变化,结果证实A20表达可以明显抑制THP1细胞内核因子NF-κB活性,同时细胞合成并释放到培养液中的重要炎症细胞因子TNF-α和IL-1β水平明显减低。在体研究[3]中,向A20转基因小鼠尾静脉直接注射LPS,发现A20转基因小鼠肺组织炎症较对照组轻,肺损伤被缓解。因此,课题组进一步采用计算机辅助分子设计方法,对天然锌指蛋白A20进行人工修饰与改造,收获了一个基于天然锌指蛋白A20抗炎分子结构的A20突变体(A20△)。本研究中以A20△转基因脓毒症小鼠为动物模型,观察动物实验性脓毒症肺损伤特点并与对照组动物进行比较,探讨A20△在体内对LPS诱导过度炎症的调节作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

72只昆明株小鼠,体质量(20±2)g,雌雄不拘,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

pCAGGS质粒由第三军医大学大坪医院野战外科研究所蒋建新研究员提供,pCAGGS-A20△质粒自行构建,LPS为美国Difco公司产品,小鼠TNF-α、IL-1β ELISA试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司,小鼠A20单克隆抗体为美国Active motif产品,进口FITC标记小鼠CD14、IgG1-FITC单克隆抗体为美国Beckman-Coulter产品。辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG购于北方同正生物公司,ELISA酶标板、显色液、终止液购于上海阿尔法生物技术有限公司,pH为9.6的$NaCO_3$-$NaHCO_3$包被缓冲液、pH为7.6的磷酸盐缓冲液(PBS)、吐温磷酸盐缓冲液(PBST)采用国产分析纯试剂自行配制。

1.3 动物实验及分组

动物分为3组,包括对照组、LPS组、A20△转基因组。对照组小鼠24只,每只小鼠尾静脉5 s内注射生理盐水(NS)1.6 ml。LPS组小鼠24只,每只小鼠尾静脉5 s内注射NS 1.6 ml,8 h后注射2.5 mg/kg的LPS。A20△转基因组小鼠24只,每只小鼠尾静脉5 s内注射pCAGGS-A20△质粒10 μg/1.6 ml NS,8 h后注射2.5 mg/kg的LPS。对照组在注射NS后3、6、12、24 h,其余各组动物在注射LPS后3、6、12、24 h,断头、取肺、称量。

1.4 指标测定

肺体指数测定:肺体指数=肺质量/体质量×1 000。单核巨噬细胞检测:采用流式细胞仪分析,具体方法见文献[3]。小鼠肺组织匀浆TNF-α、IL-1β测定:采用ELISA法,详细方法见说明书,肺组织匀浆制备方法见文献[3]。肺组织A20表达测定:采用ELISA,具体方法见文献[3]。肺组织病理检查:按常规完成。

1.5 统计学处理

采用Microsoft Excel 2003软件进行统计学处理。数据资料以$\bar{x}\pm s$表示,计量资料的两两比较采用t检验。

2 结果

2.1 肺组织匀浆A20表达测定

LPS组A20表达从LPS注射后12 h起高于对照组($P<0.05$),A20△转基因组各时相点A20表达均较对照组升高($P<0.01$),A20△转基因组A20表达在3~6 h较LPS组升高($P<0.01$),说明转基因小鼠肺组织A20表达增加。结果见表1。

表1 各组肺组织匀浆A20表达测定结果[D(540),$n=6$, $\bar{x}\pm s$]

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
对照组	0.08±0.02	0.07±0.02	0.08±0.03	0.09±0.03
LPS组	0.10±0.03	0.16±0.05	0.60±0.10[a]	0.59±0.07[b]
A20△转基因组	0.32±0.11[bc]	0.54±0.12[bc]	0.69±0.14[b]	0.73±0.13[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.01$,与LPS组比较

2.2 肺体指数测定

LPS组小鼠肺体指数从6 h起较对照组升高($P<0.05$, $P<0.01$)。A20△转基因组小鼠肺体指数与对照组比差异无统计学意义($P>0.05$)。A20△转基因组小鼠肺体指数与LPS组比较,在6~24 h均有明显降低($P<0.05$,$P<0.01$),提示A20△转基因组小鼠肺组织水肿较LPS组轻。结果见表2。

表2 各组肺体指数测定结果($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
对照组	6.27±0.66	6.31±0.72	6.71±0.89	6.18±1.21
LPS组	7.00±0.63	7.42±0.59[a]	7.79±0.92[b]	8.20±0.86[a]
A20△转基因组	6.47±0.54	6.73±0.40[d]	6.92±0.54[c]	6.91±0.40[d]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与LPS组比较

2.3 肺组织单核巨噬细胞检测

LPS组和A20△转基因组肺组织中单核巨噬细胞数明显较对照组升高($P<0.05$,$P<0.01$),A20△转基因组肺组织中单核巨噬细胞数明显较LPS组降低($P<0.01$),表明A20△转基因组单核巨噬细胞浸润有被明显抑制表现。结果见表3。

表3 各组肺组织单核巨噬细胞检测结果(%,$n=6$,$\bar{x}\pm s$)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
对照组	0.04±0.01	0.07±0.02	0.054±0.01	0.05±0.02
LPS组	8.89±2.11[a]	10.09±1.95[a]	8.04±2.43[a]	5.54±1.77[a]
A20△转基因组	0.61±0.26[ac]	0.61±0.21[ac]	0.49±0.39[bc]	0.41±0.31[bc]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.01$,与LPS组比较

2.4 肺组织匀浆TNF-α和IL-1β测定

对照组肺组织匀浆中TNF-α水平明显低于LPS组和A20△转基因组($P<0.05$,$P<0.01$),IL-1β水平也明显低于LPS组和A20△转基因组($P<0.01$)。A20△转基因组在3~6 h明显低于LPS组($P<0.05$,$P<0.01$),表明A20△可以在一定程度上抑制肺组织细胞产生和释放TNF-α和IL-1β。结果见表4、5。

表4 各组肺组织匀浆TNF-α测定结果(pg/ml,$n=6$,$\bar{x}\pm s$)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
对照组	45.41±17.31	39.49±12.45	43.69±14.49	44.43±15.96
LPS组	412.41±76.65[b]	431.20±89.43[b]	196.06±90.70[a]	116.27±35.61[b]
A20△转基因组	241.52±68.14[bc]	203.43±71.14[bc]	165.95±77.00[b]	91.34±23.52[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.01$,与LPS组比较

表5 各组肺组织匀浆IL-1β测定结果(ng/ml,$n=6$,$\bar{x}\pm s$)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
对照组	1.02±0.08	1.06±0.12	1.06±1.10	1.14±0.09
LPS组	9.66±5.70[a]	15.63±4.53[a]	12.14±2.70[a]	9.24±1.75[a]
A20△转基因组	6.63±1.89[ab]	9.11±1.36[ac]	10.02±1.66[a]	8.43±0.90[a]

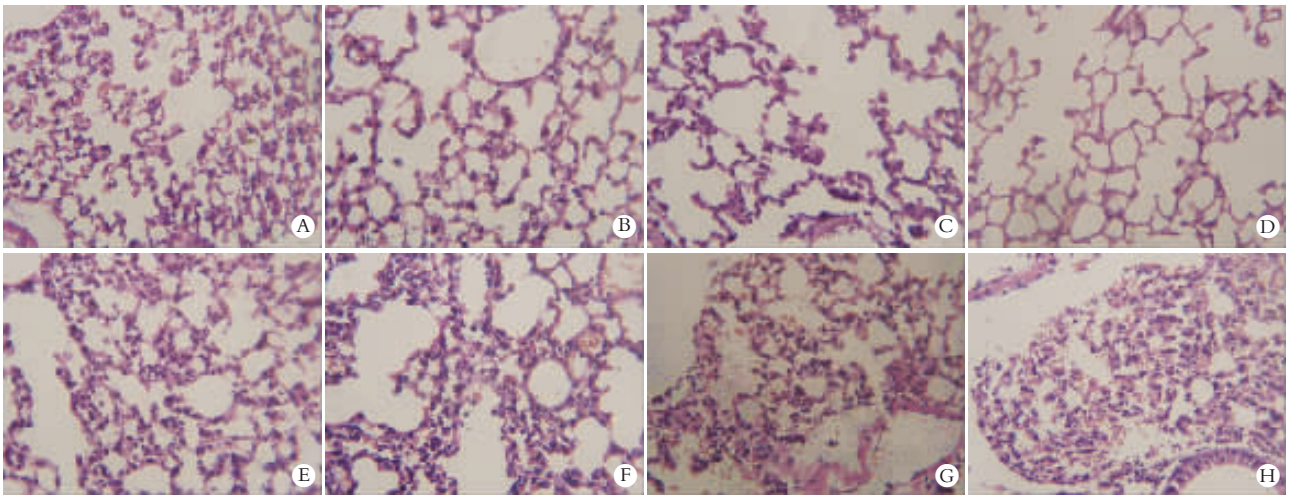
a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与LPS组比较

2.5 肺组织病理分析

注射LPS后3 h,LPS组可见肺组织有明显充血、炎性细胞浸润和肺泡腔内积液出现;随着时间的延长,肺组织发生广泛严重充血、大量炎性细胞浸润并扩散到肺泡腔内,肺间质逐步增厚,同时肺泡腔内积液增多,肺泡水肿发生,至24 h可见肺泡塌陷发生。A20△转基因预处理小鼠,注射LPS后充血情况相对于相应时相点LPS组小鼠明显减轻,肺组织中浸润的炎性细胞数量也明显减少,肺泡内积液明显减少,无肺泡塌陷发生。结果见图1。

3 讨论

锌指蛋白A20是体内细胞在炎症应答极早期产生的一种胞浆蛋白,其N半端具有去泛素化功能,抑制蛋白酶体对靶蛋白降解;C半端含有7个特殊Cys2/Cys2型锌指结构,具有催化靶蛋白泛素化进而促进蛋白酶体对靶蛋白降解的作用。A20将泛素化与去泛素化功能集于一身,特异性地通过对核因子NF-κB、AP-1活性及表达的调节,参与炎症时机体对自身组织细胞的保护,表现出抗炎、抗凋亡的双重效果[4-6]。近期研究[7,8]发现,A20表达能够抑制DC细胞的活化,阻止单核细胞与血管内皮细胞之间的黏附,从感染性炎症的上游环节对炎症进行调节。刘渤等[9]研究表明,创伤感染的早期A20作为一种参与体内炎症反应调控的内源性蛋白,在LPS刺激时即可在肝组织中高表达。由此,我们推测内毒素血症时肺组织中也可能存在A20的表达,该推测在本研究LPS组肺组织A20表达测定中得到证实,提示此时肺组织A20表达旨在调控LPS诱导的肺组织炎症,对机体可能起到一种炎症保护作用,该推测在课题组A20转基因小鼠LPS致肺损伤研究[3]中得到证实,展示了A20作为炎症干预新措施的美好前景。为取得相应知识产权,课题组利用计算机分子设计工作站,对天然A20蛋白实施基因改造与修饰,使A20抗炎功能基团更加稳定,同时基因中G+C碱基的百分含量提高到适合毕赤酵母表达水平,为验证该A20突变体的生物活性,本研究利用A20



A~D:分别为A20△转基因组3、6、12、24 h;E~H:分别为LPS组3、6、12、24 h

图1 小鼠肺组织病理学观察 (HE ×100)

突变体转基因动物模型,初步观察了该模型处于实验性脓毒症时肺组织炎症损伤情况。结果显示,所设计的A20突变体在一定程度上能够减轻模型小鼠肺组织炎症损伤,提示通过分子设计获得的A20突变体具有与天然A20蛋白相似的炎症损伤保护作用。上述结果为下一步A20突变体的生物合成均奠定了较好基础。

本研究中,课题组曾经尝试用脂质体包裹A20突变体质粒,将其制作成A20突变体质粒脂质体微球,以提高质粒的生物利用度和在肺脏的聚集量,实验表明脂质体对小鼠的毒副作用明显较裸质粒严重,且容易造成小鼠肺栓塞,导致实验动物非研究性因素死亡,而采用的直接快速裸质粒生理盐水尾静脉注射,操作简便,省去了脂质体加工以及病毒载体制备等环节,转基因效果较为满意,可以为相关研究借鉴。

参考文献:

[1] Ding J, Song D, Ye X, *et al*. A pivotal role of endothelial-specific NF-kappaB signaling in the pathogenesis of septic shock and septic vascular dysfunction[J]. J Immunol, 2009, 183(6): 4031 - 4038.

[2] 吴丽娟,刘国栋,陈伟,等. 锌指蛋白A20对人单核细胞LPS应答的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(14): 1388 - 1390.

[3] 吴丽娟,毕玉田,李增鹏, 等. 锌指蛋白A20转基因预处理对小鼠内毒素血症肺组织炎症损伤的影响[J]. 中华创伤杂志, 2009, 25(2): 182 - 184.

[4] Beyaert R, Heyninck K , Van-Huffel S. A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60(8): 1143 - 1151.

[5] Wertz I E, O'Rourke K M, Zhou H, *et al*. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling[J]. Nature, 2004, 430(7000): 694 - 699.

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

[7] Zeng W, Li L, Yuan W, *et al*. A20 overexpression inhibits low shear flow-induced CD14-positive monocyte recruitment to endothelial cells [J]. Biorheology, 2009, 46(1): 21 - 30.

[8] Breckpot K, Aerts-Toegaert C, Heirman C, *et al*. Attenuated expression of A20 markedly increases the efficacy of double-stranded RNA-activated dendritic cells as an anti-cancer vaccine[J]. J Immunol, 2009, 182(2): 860 - 870.

[9] 刘渤,蒋建新,朱佩芳,等. 锌指蛋白A20在创伤感染时对小鼠肝组织的影响[J]. 中华实验外科杂志,2003, 20(10): 897 - 899.

(**收稿**:2009-09-07;**修回**:2009-12-03)

(编辑 张 维)

(上接434页)

一般小于3.0 cm。骨平滑肌肿瘤与其他部位平滑肌瘤具有相同组织学特征,形态单一的梭形细胞呈束状编织状排列,核分裂相极为罕见;瘤细胞SMA和desmin染色阳性;有时可出现与血管平滑肌瘤相似的后壁血管。一般归属良性肿瘤,当局部刮除灭活彻底后可望得到完全治愈。

骨平滑肌瘤临床少见,Vaillo-Vinagre等[1]曾报道过1例28岁右髂骨平滑肌瘤女性患者。临床上诊断较困难,需与骨巨细胞瘤、骨平滑肌肉瘤等鉴别。骨平滑肌瘤的X线片主要表现为溶骨性改变,常为多灶性,可出现硬化性边缘,有时可出现骨皮质膨胀。骨巨细胞瘤的X线片主要表现为侵及骨骺的溶骨性、偏心性、膨胀性病灶,病变部骨皮质变薄,呈肥皂泡样改变[2],但无硬化边缘,无反应性新骨生成。骨平滑肌肉瘤的X线片表现为干骺端或近干骺端骨干形态不规则骨质破坏区,边缘模糊,骨皮质变薄,部分缺损严重者可造成1段骨干完全消失;一般无骨膜反应征象,少数病例可出现针状及Codman三角;肿瘤突破骨皮质时,可于软组织中形成肿块[3];此外,骨肉瘤患者血清碱性磷酸酶高于正常,也可鉴别诊断。一般情况最终确诊仍需病理诊断。

本例中患者肩胛骨平滑肌瘤瘤体直径约6.0 cm,若按照软组织平滑肌肿瘤直径大小分类,直径超过5.0 cm者,一般都考虑为恶性肿瘤[4]。但该患者病程较长,病情无明显急进性进展,无明显夜间痛,ECT未见全身其他部位有转移征象,病理未见明显核分裂相,故综合考虑良性骨肿瘤可能性大。此外,临床上无论平滑肌瘤还是平滑肌肉瘤,主要治疗手段以手术为主,放、化疗一般无效[5,6]。

参考文献:

[1] Vaillo-Vinagre A, Ballestin-Carcavilla C, Madero-Garcia S, *et al*. Primary angioleiomyoma of the iliac bone: clinical pathological study of one case with flow cytometric DNA content and S-phase fraction analysis[J]. Skeletal Radiol, 2000, 29(3): 181 - 185.

[2] 陆裕朴,胥少汀,葛宝丰,等. 实用骨科学[M]. 北京:人民军医出版社,2006: 1418.

[3] 詹利平. 骨平滑肌肉瘤一例[J]. 临床放射学杂志, 2001, 20(12): 911.

[4] 侯英勇,谭云山,许建芳,等. 腹腔软组织平滑肌肿瘤临床病理分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2006, 22(4): 397 - 401.

[5] 燕太强,杨荣利,郭卫,等. 胫骨平滑肌肉瘤伴全身多发骨转移一例[J]. 北京大学学报:医学版, 2007, 39(4): 369 - 373.

[6] 张文福,孙建梅,付明磊. 胃平滑肌肿瘤的临床探讨[J]. 河南医药信息, 2002, 10(7): 17 - 18.

(**收稿**:2009-09-05;**修回**:2009-10-31)

(编辑 邓强庭)