DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.07.012
第26卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 7
2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

文章编号:1000-5404(2004)07-0591-03

论著

转染锌指蛋白基因A20抑制内毒素诱导的内皮细胞IL-8表达的研究

糜建红,朱楚洪,应大君 (第三军医大学基础医学部解剖学教研室,重庆市生物力学实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨转染外源性锌指蛋白基因A20对内毒素诱导的内皮细胞白细胞介素-8(IL-8)表达的影响。方法 DOTAP脂质体介导pcDNA3.1EHA20质粒转染人脐静脉内皮细胞,经G418筛选,免疫荧光检测A20基因的表达,双抗夹心ELISA法检测内皮细胞分泌IL-8的含量变化。结果 A20基因在经G418筛选后的内皮细胞中得到高效表达;内毒素能刺激人内皮细胞分泌IL-8;A20基因能减少70%以上内毒素诱导的内皮细胞IL-8的分泌,两者间相差显著($P<0.05$)。结论 转染外源性A20基因能够显著抑制内毒素诱导的内皮细胞活化,有助于炎症的治疗。

关键词:A20基因;IL-8;内毒素
中图法分类号:R392.11;R394-33;R394.3 文献标识码:A

Zinc finger protein gene A20 inhibits lipopolysaccharide-induced IL-8 expression of endothelial cells

MI Jian-hong, ZHU Chu-hong, YING Da-jun (Department of Anatomy, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of zinc finger protein gene A20 on the inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced interleukin-8 (IL-8) expression in endothelial cells. Methods Plasmid pcDNA3.1EHA20 was transfected into human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by DOTAP method. The positive cell clones were screened with G418. The stable transfection and expression of A20 in HUVECs were determined by immunofluorescent analysis. IL-8 expression was detected by sandwich ELISA with double monoclonal antibodies. Results High expression of A20 gene in HUVECs transfected with pCDNA3.1EHA20 was confirmed by immunofluorescent analysis. IL-8 expression increased in LPS-induced endothelial cells. A20 gene could inhibit more than 70% LPS-induced IL-8 expression ($P<0.05$). Conclusion Transfection of A20 gene in HUVECs can inhibit the LPS-induced activation of endothelial cells, which is helpful for the treatment of inflammation.

Key words: A20 gene; interleukin-8; lipopolysaccharide

研究表明内毒素(lipopolysaccharide, LPS)在感染、创伤时增高,参与组织损伤的病理进程,可直接导致内皮细胞活化损伤,导致趋化因子如白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)等表达[1]。IL-8是介导炎症反应的主要趋化细胞因子之一,可激活中性粒细胞,对炎症反应过程有重要的调节作用。A20基因属锌指蛋白家族,在内皮细胞受外界损伤因子刺激时能保护细胞,属内皮细胞保护基因,最先确定是在肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-alpha, TNF-α)诱导的内皮细胞中获得,能完全阻止TNF诱导的NF-kappaB依赖的基因如IL-6、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子等的表达。基因敲除实验表明A20基因是机体抵抗炎症不可缺少的重要功能基因[2,3],研究A20基因对内毒素诱导的内皮细胞IL-8表达,将为炎症的治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株和试剂

pcDNA3.1EHA20(EHA20为人A20cDNA N末端标记E-tag序列GGT GCG CCG GTG CCG TAT CCG GAC CCG CTG GAA CCG CGT)质粒为本实验室保存,由比利时LMBP提供相应A20cDNA质粒在本实验室构建而成。DOTAP脂质体转染试剂、E-tag抗

基金项目:全军"十五"青年基金资助项目(01Q098)、教育部生物力学及组织工程重点实验室访问学者基金及重庆市科学基金资助项目(2001060)
Supported by the "Tenth Five-year Plan" Foundation for Young Scholars of PLA (01Q098), Visiting Scholar Foundation for Key Lab for Biomechanics &Tissue Engineering of Ministry of Education, and Fund for Sci &Tech Research of Chongqing (2001060)
作者简介:糜建红(1961-),女,江苏省无锡市人,高级实验师,主要从事血管生物力学与分子生物学方面的研究。电话:(023)68752225
收稿日期:2003-07-22;修回日期:2003-09-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

体购自美国 Amersham Pharmacia Biotech, M199 培养基及胎牛血清购自 HLycone 公司, G418 为美国 Gibico 公司产品, 胶原酶、胰蛋白酶、LPS 及内皮生长因子为 SIGMA 公司产品, IL-8 ELISA 试剂盒为北京邦定泰克公司产品。SABC-Cy3 荧光试剂盒为武汉博士德公司产品。

1.2 A20 基因转染

无菌条件下取人脐静脉长约 10 cm, 常规方法获取细胞, 以 1×10^5/ml 的浓度接种细胞, 培养基为含 20%胎牛血清的 M199 液, 90 mg/L 肝素钠, 25 mg/L 内皮生长因子, 培养 1~2 周, 细胞汇合后传代。内皮细胞生长至 80%融合时, 采用 DOTAP 脂质体介导将 pcDNA3.1 EHA20 转染内皮细胞, 18 h 后弃去转染液, 换含 10%胎牛血清的 M199 培养液培养 2 d, 弃去原培养液, 用含 G418 300 μg/ml 的 M199 培养液进行筛选, 2 周后收集 G418 抗性细胞, 分不同培养瓶继续在 300 μg/ml 的 G418 筛选下培养 4 周, 按常规在细胞融合时消化、传代, 并在倒置显微镜下动态观察转染前后细胞形态的变化。转染 pcDNA3.1 及未转染的内皮细胞同样用含 G418 300 μg/ml 的 M199 培养液进行培养作为对照[4,5]。

1.3 选择表达 A20 基因的抗 G418 阳性克隆细胞

转染 pcDNA3.1EHA20 重组质粒后的抗 G418 单克隆细胞继续培养 4 周, 经丙酮固定, 加 1∶50 PBS 稀释的正常羊血清, 室温孵育 10 min, 去除多余血清, 不洗, 滴加鼠抗人 E-tag 单克隆抗体(HA20cDNA N 末端标记 E-tag 序列, 因人体不含有此片段, 故可用鼠抗人 E-tag 抗体检测细胞中目的基因的表达情况), 4 ℃过夜, 滴加生物素化的羊抗鼠 IgG, 20~37 ℃孵育 30 min, 再滴加 SABC-Cy3, 20~37 ℃孵育 30 min, 上述各步之间均以 PBS 充分振荡洗涤, 最后用 PBS 甘油封片。激光共聚焦荧光显微镜照相。转染 pcDNA3.1、未转染质粒的内皮细胞作为对照。选择出高表达 A20 基因的抗 G418 阳性克隆细胞用于后续实验。

1.4 IL-8 表达的检测

将转染 A20 基因及 pcDNA3.1 的内皮细胞制成悬液, 调整细胞密度后分种于 24 孔板上(1%明胶包被), 置 37 ℃ 5%CO_2 条件下培养, 至形成致密单层后, 去除培养上清, 冲洗后的细胞单层用于后续实验。内毒素损伤组加入含 0.1 mg/L LPS 的无血清 M199 培养液, 对照组用不含 LPS 的无血清 M199 培养液, 于 37 ℃ 5%CO_2 培养箱作用 6 h, 收集上清, 采用双抗夹心 ELISA 法检测 IL-8 的含量, 具体方法参照文献[6]。

1.5 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS6.0 处理, 行 t 检验。

2 结果

2.1 A20 基因表达检测

实验表明经 DOTAP 介导转染、并经 G418 选择的阳性细胞中, A20 基因表达细胞达 95%以上, 选择 A20 基因高表达细胞群培养用于后续实验。激光共聚焦显微镜观察可见转染 pcDNA3.1EHA20 的内皮细胞胞浆中有很强的红色荧光, 胞核区未见荧光。而转染 pcDNA3.1、未转染质粒的内皮细胞未见红色荧光(图 1)。

2.2 LPS 诱导的内皮细胞 IL-8 表达

内毒素作用内皮细胞 6 h, ELISA 检测表明 IL-8 的含量较对照组明显升高, 达(610±46) pg/ml, 两者间相差显著($P<0.05$); 而 A20 基因能减少 70%以上内毒素诱导的内皮细胞释放 IL-8, 仅为(160±34) pg/ml。



图 1 免疫荧光组织化学检测内皮细胞 **A20** 基因表达 (×400)

Fig 1 Expression of A20 in the transfected endothelial cells detected by fluorescence histochemistry (×400)

3 讨论

炎症早期血液中内毒素的含量即有明显增高, 是导致多器官损害的重要因素。由于内皮细胞在心血管广泛分布, 成为 LPS 损伤最早涉及的靶细胞[7]。IL-8 属于 C-X-C 亚家族, 基因全长 5 191 bp, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 内含子区域含有 CAT 样结构(CAT-like structure)和 TATA 盒(TATA box)。5′-侧翼区含有核因子(NF-κB)、激活蛋白-1(activated protein-1, AP-1)等转录因子的结合位点。IL-8 可激活中性粒细胞, 诱导其变形、趋化及合成生物活性脂类; 此外, IL-8 对 T 淋巴细胞和嗜碱性粒细胞也有趋化作用[8]。Wolff 等实验表明炎症反应时, 内皮细胞可分泌 IL-8, 并可使白细胞趋化引起炎症反应[9]。本实验也观察到在正常的内皮细胞中仅见微量的 IL-8, 但在 LPS 诱导的内皮细胞中可见 IL-8 含量明显增高。

内毒素可通过激活免疫细胞分泌 IL-1、TNF-α, 从而促进内皮细胞分泌 IL-8, 本身也可直接活化内皮细胞, 促进 IL-8 的合成。本实验检测内毒素诱导人脐静脉内皮细胞分泌 IL-8 的含量变化, 结果显示, 内毒素刺激 6 h 后, IL-8 在内皮细胞中的分泌量明显增加, 而 A20 基因能减少 70%以上内毒素诱导的内皮细胞分泌 IL-8, 其机制可能是 IL-8 含有 NF-κB 结合位点, 而 A20 能抑制内毒素诱导的 NF-κB 活化, 从而减少内毒素诱导的内皮细胞分泌 IL-8。

本实验构建的真核表达重组体 pcDNA3.1EHA20, 因 HA20cDNA N 末端标记 E-tag 序列因人体不含有此片段, 故可用鼠抗人 E-tag 抗体检测细胞中目的基因的表达情

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

况。因 E-tag 标记在 HA20cDNA N 末端，E-tag 有强表达说明 HA20 目的基因转染成功并有强表达[8]。

IL-8 是介导炎症反应的主要趋化因子之一，本实验结果表明 A20 基因能抑制内毒素诱导的血管内皮细胞 IL-8 表达，说明 A20 基因在炎症治疗方面具有一定的应用前景。

参考文献：

[1] Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic[J]. Nature, 1998, 392(6676): 565－568.
[2] Grey S T, Arvelo M B, Hasenkamp W, *et al*. A20 inhibits cytokine-induced apoptosis and nuclear factor kappaB-dependent gene activation in islets[J]. J Exp Med, 1999, 190(8): 1135－1146.
[3] Lee E G, Boone D L, Chai S, *et al*. Failure to regulate TNF-induced NF-κB and cell death responses in A20-deficient mice[J]. Science, 2000, 289(5488): 2350－2354.
[4] 朱楚洪，应大君，李黔宁，等. A20 基因抑制内皮细胞组织因子表达的研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志，2002，16(6)：404－407.
[5] 朱楚洪，应大君. A20 基因在血管内皮细胞中的表达研究[J]. 解剖学报，2003，34(1)：49－53.
[6] 刘 苇，金伯泉，董邦权，等. 6 株 rhIL-8 单克隆抗体识别表位的鉴定及双单克隆抗体夹心法 ELISA 检测 IL-8 方法的建立[J]. 中国免疫学杂志，1994，10(3)：131－133.
[7] Abello P A, Fidler S A, Bulkley G B, *et al*. Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death(apoptosis) by endotoxin[J]. Arch Surg, 1994, 129(2): 134－141.
[8] 张文胜，陈槐卿. 白细胞介素-8 研究进展[J]. 生物医学工程学杂志，2002，19(4)：697－702.
[9] Wolff B, Burse A, Middleton J, *et al*. Endothelial cell "memory" of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin-8 in Weibel-Palade bodies[J]. J Exp Med, 1998, 188(9): 1757－1762.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2004)07-0593-01

个案与短篇

绝经后巨大绒毛膜癌 1 例

Postmenopausal choriocarcinoma: a case report

何 畏，熊光武，卢春梅，史常旭 （第三军医大学西南医院妇产科，重庆 400038）

绒毛膜癌是生育年龄妇女多见的一种滋养细胞来源的恶性肿瘤，发生在绝经后的较少见，且容易被误诊为子宫内膜癌、子宫肌瘤或子宫肉瘤等[1]。由于该病的治疗原则与一般恶性肿瘤完全不同，故准确而及时的诊断对患者的预后具有十分重要的意义。我院今年成功地诊治了 1 例绝经后绒毛膜癌患者，现报告如下。

1 临床资料

患者，57 岁，因"阴道流血 1 年，加重 1 个月"于 2003 年 1 月 5 日入院。入院前 2 年自然绝经，1 年前无明显诱因出现阴道流血，量少，淋漓不净，无周期性；1 个月前突然阴道流血增多，伴头晕、乏力、体力下降，外院 B 超检查提示盆腔包块。平素月经规律，量中，无痛经史；G3 P3，末次妊娠于 21 年前，10 年前取环。1 年前发现高血压，一直服用复方降压片。入院查体血压 174/104 mmHg，中度贫血貌，脐耻之间扪及孕 4 个月大小之类圆形包块，无压痛，移动性浊音阴性。妇检：阴道通畅，内见少量暗红色血，无异味；宫颈光滑，内口处见息肉样物，无触血；宫体增大约 4 月孕大小，质硬，活动可，无压痛；双侧附件未扪及包块。辅助检查血色素 67 g/L，B 超：子宫 10.3 cm×8.6 cm×10.5 cm，后壁见 6.9 cm×11.0 cm 实质性不均质块影，边界欠清，边缘不规则；CDFI 边缘血流显示记录到低速低阻力血流频谱。胸片、心电图正常，宫颈组织活检提示为退变组织，颈管粘膜炎性息肉。入院诊断为：①盆腔包块待查：（子宫肌瘤变性、子宫内膜癌、子宫肉瘤）；②高血压病；③中度贫血。2003 年 1 月 7 日行分段诊刮术，在宫颈管和宫腔分别刮出少许组织，感宫后壁有突起，诊刮中因大量鲜红色血突然涌出，约 300 ml，立即终止，对症治疗后好转。术后反复检查刮出物似坏死组织，急查尿 HCG 为强阳性，血 HCG 38 650 miu/ml，初步诊断为绝经后绒癌或胎盘附着部位滋养细胞肿瘤。病理报告为（颈管）坏死组织中见少量退变癌组织，（宫腔）坏死组织中见癌细胞，考虑绒癌。1 月 9 日开始行 EMA-CO 方案化疗。1 月 17 日和 1 月 27 日的血 HCG 分别为 30 550 和 28 390 miu/ml，因血 HCG 下降欠满意，肿瘤组织巨大，于 1 月 28 日行次广泛子宫切除术加盆腔淋巴结清扫术。术中见：子宫增大 3 月孕大小，表面光滑，各韧带松软，无异常；双附件未见异常；双侧腹股沟、髂外淋巴结稍大，质中，活动。术后病理报告为子宫绒毛膜癌，淋巴结慢性炎。术后继续定时按原方案化疗，血 HCG 迅速下降至 9.82、8.2、6.33 miu/ml，第 6 次化疗后，血 HCG 正常，病员自行回当地治疗，随访至今血 HCG 持续在正常范围。

2 讨论

绒毛膜癌是一种继发于正常或异常妊娠后的滋养细胞疾

（下转 597 页）

作者简介：何 畏（1970－），女，四川省蓬溪县人，主治医师，主要从事计划生育、妇科肿瘤方面的研究。电话：(023)68754412

收稿日期：2003-08-18；修回日期：2003-12-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net