DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.036
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
702 2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)06-0702-03

严重烫伤小鼠巨噬细胞内IL-10 mRNA、AP-1的变化及与ERK信号途径的关系

王 勇,彭代智,黄文华,吴 军 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察伤后不同时相点腹腔巨噬细胞内IL-10 mRNA、活化蛋白-1(AP-1)的变化及给予$MEK_{1/2}$特异性阻断剂PD98059后IL-10 mRNA的改变,以阐明MAPK信号途径中的ERK信号通路是否调控IL-10 mRNA的生成。方法 以15%体表面积Ⅲ度烫伤小鼠为模型,收集腹腔巨噬细胞,电泳迁移率改变分析法测AP-1的活性,反转录PCR测IL-10 mRNA的表达。结果 烧伤后巨噬细胞内IL-10 mRNA的表达呈降低趋势,伤后12 h最低。AP-1于伤后被激活,伤后6 h活性最强。与单纯烫伤相比,PD98059组的IL-10 mRNA的表达量无明显变化。结论 严重烧伤后巨噬细胞内MAPK信号途径被激活,其中IL-10 mRNA的表达不受ERK信号通路调控,可能受P38、JNK信号通路调控。

关键词:烧伤;巨噬细胞;活化蛋白-1;IL-10 mRNA;ERK信号途径
中图法分类号:R392.12;R394.2;R644 文献标识码:A

Changes of IL-10 mRNA expression, AP-1 activity and their relation with ERK signal pathway of macrophages in severely scalded mice

WANG Yong, PENG Dai-zhi, HUANG Wen-hua, WU Jun (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the dynamic changes of IL-10 mRNA expression, Activator protein-1 (AP-1) activity of peritoneal macrophages (PMΦ) at different time intervals following scald and examine whether IL-10 mRNA is regulated by ERK signal pathway after $MEK_{1/2}$ inhibitor PD98059 was used. Methods The experimental model of 15% TBSA full thickness scalded by vapor in mice was prepared and PMΦ were collected. AP-1 activity was measured by EMSA and IL-10 mRNA by RT-PCR. Results Expression of IL-10 mRNA by murine PMΦ decreased after scald and dropped to the lowest level at 12 PBH (postburn hours). AP-1 was activated and reached its peak at 6 PBH. Compared to simple burns, there was no obvious change for IL-10 mRNA expression after using PD98059. Conclusion MAPK signal pathway of macrophages is activated following severe burns, IL-10 mRNA expression is not regulated by ERK pathway but probably by P38, JNK pathway.

Key words: burns; macrophages; activator protein-1; IL-10 mRNA; eRK signal pathway

临床与实验研究均表明,严重烧伤后机体免疫功能紊乱,既有免疫抑制的一面,也有免疫亢进的一面,其原因十分复杂。巨噬细胞在严重烧伤后吞噬功能降低,抗原提呈功能减弱,尤其分泌众多的致炎及抗炎介质,如TNF-α、IL-1、IL-10、IL-6、IL-8、PGE_2等,参与了机体的免疫紊乱与脏器损害。故我们认为巨噬细胞(Macrophages,MΦ)在严重烧伤后早期免疫功能变化中可能起十分重要的作用。严重烧伤后MΦ生成过多的TNF-α不仅介导机体的炎症过程,可能发生全身炎症反应综合征,而且还是导致脓毒性休克,多器官功能衰竭的重要原因之一[1]。IL-10也是MΦ分泌的细胞因子之一,它可抑制巨噬细胞释放TNF-α,提高IL-1 Ra的含量,具有抗炎效应[2],TNF-α与IL-10的平衡可能在烧伤中扮演一个关键的角色。另外,细胞受到刺激后可通过复杂的信号转导途径而产生相应的细胞因子。核转录因子之一——活化蛋白-1(Activator protein-1,AP-1)受控于丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen activated protein kinases,MAPK)信号途径,为MAPK的亚型-细胞外信息调节蛋白激酶(Extracellular signal-regulated protein kinase, ERK)、应激活化蛋白激酶(Stress-activated protein kinase, SAPK)、蛋白激酶P38共同的下游底物之一,调控细胞的增殖,分化与炎症基因的表达[3]。研究表明,MAPK信号途径调控IL-10的生成[4]。但严重烫伤后巨噬细胞内IL-10 mRNA的变化规律及AP-1所相关的MAPK途径中的ERK通路是否参与了IL-10 mRNA的生成,目前尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立及实验分组

将正常健康封闭群昆明种小白鼠[体重(22±2)g] 30只,随机分为6组,5只/组。以本所小鼠常规烧伤模型致伤,即背部剪毛,然后固定,清醒状态下高压蒸汽造成体表面积15% Ⅲ度烫伤(病理切片证实)。伤后立即腹腔注射生理盐水2ml以抗休克,实验按烫伤后不同时相分为6组,即0(正常对照组)、2、6、12、24、48 h 6组。

另外,我们选择伤后12 h的PMΦ为调控对象。设正常对照组,单纯烫伤组,烫伤加三七总皂甙组,烫伤加PDTC组,烫伤加H-7组,烫伤加PD98059组。其中三七总皂甙的终浓度为0.8 mg/ml,作用时间90 min;NF-κB抑制剂(Pyrrolidine dithiocarba-

基金项目:全军"九五"指令性课题(96L042)
作者简介:王 勇(1970-),男,湖南省吉首市人,硕士,主治医师,主要从事烧伤免疫方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68754135
收稿日期:2000-08-15;修回日期:2001-04-20

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

mate, PDTC)的终浓度为 100 μmol/L, 作用时间 90 min; (Protein kinase C) PKC 抑制剂 H-7 的终浓度为 50 μmol/L, 作用时间 60 min; $MEK_{1/2}$抑制剂 PD98059 的终浓度为 50 μmol/L, 作用时间 60 min。

1.2　腹腔巨噬细胞(PMΦ)的分离、纯化及培养

在各时相点, 经腋下放血活杀小鼠, 常规无菌条件下以预冷的 PBS (pH 7.2) 5 ml 分次灌洗腹腔, 获取腹腔细胞。常规离心后弃上清液, 再以 RPMI 1640 液 1～2 ml 重悬细胞, 行细胞计数(经酯酶染色显示 PMΦ ≈80%, 台盼蓝染色示细胞活力>95%)。在 6 孔细胞培养板中每孔加入 3.5×10^6 个腹腔细胞, 一式三孔, 孵育 90 min, 弃上清液, 每孔加入 3 ml RPMI1640 液, 细胞培养 2 h 后, 用冷 PBS 收集细胞以提取核蛋白及胞浆蛋白。

1.3　IL-10 mRNA 的表达

常规方法提取细胞总 RNA, 选 RNA 样本 2 μg, 采用反转录-多聚酶链式反应(RT-PCR)检测 IL-10 mRNA 的表达[5]。引物的序列为: ①IL-10: 正义: 5' ACC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA 3'; 反义: 5' CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A 3', 大小: 237 bp。②β-actin: 正义: 5' TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C 3'; 反义: 5' TAA AAA CGC AGC TCA GTA ACA GTC CG 3', 大小: 348 bp。

1.4　小鼠腹腔巨噬细胞核蛋白抽提及 AP-1 活性的检测

1.4.1　探针序列　由上海生工合成的小鼠通用型 AP-1 探针。P1: 5' CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA 3'; P2: 5' TTC CGG CTG ACT CAT CAA GCG 3'。

1.4.2　核蛋白抽提及电泳迁移率改变分析法(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)检测 AP-1 的活性[6,7]　核蛋白经蛋白定量后取 3 μg、DNA 结合缓冲液 17 μl、标记探针 1 μl, 总反应体积 21 μl, 置 37 ℃孵育 30 min, 然后加上样缓冲液 4 μl。反应产物经 5%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(0.25× TBE, pH 8.3, 电压 110 V)。电泳完毕, 凝胶置−70 ℃放射自显影。

1.5　统计学处理

电泳带用凝胶图像分析仪行密度扫描, 半定量分析, 用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 行 t 检验及相关分析。

2　结果

2.1　烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内 AP-1 活性的变化趋势

我们用凝胶电泳迁移率改变分析法来检测小鼠腹腔巨噬细胞核内 AP-1 的活性。由图 1 可看出, AP-1 的活性于烫伤后被激活, 伤后逐步升高, 6 h 达到高峰, 以后呈下降趋势, 48 h 已接近于正常。

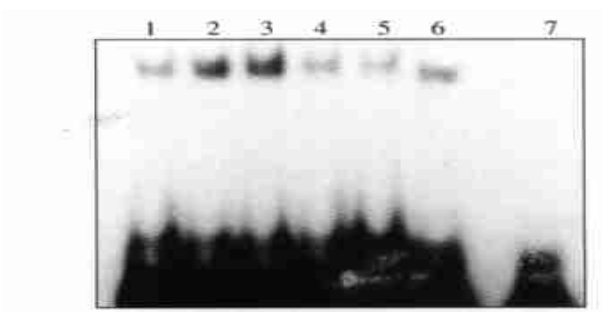


图 1　严重烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内 **AP-1** 活性的变化

Fig 1　Dynamic changes of AP-1 activity of murine peritoneal macrophages after severe scald

1: Normal control; 2～6: Post burn 2, 6, 12, 24, 48 h; 7: Negative control

2.2　烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内 IL-10 mRNA 表达的变化趋势

本实验中以小分子量标准品 DNA 及β-actin(348 bp)为位置参照, 小鼠 PMΦ 内 IL-10 mRNA 经 PCR 扩增后在琼脂糖电泳中的位置为 237 bp。结果显示, 从总趋势来看, 伤后早期 IL-10 mRNA 的表达量呈下降趋势, 伤后 2 h 即开始下降, 至 12 h 表达量降至最低。伤后 24 h, 48 h 迅速回升, 与正常对照的表达水平相似。3 次结果基本一致, 见图 2。

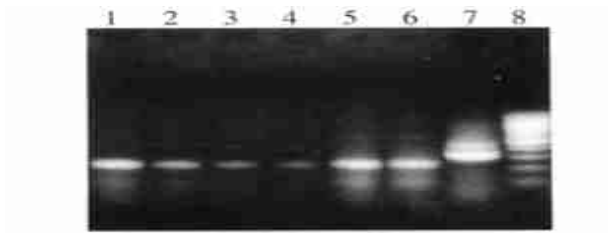


图 2　严重烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内 **IL-10 mRNA** 表达的变化

Fig 2　Changes of IL-10 mRNA expression of murine peritoneal macrophages after severe scald

1: Normal control; 2～6: Post burn 2, 6, 12, 24, 48 h; 7: β-actin; 8: DNA Marker

2.3　$MEK_{1/2}$抑制剂 PD98059 对伤后巨噬细胞内 AP-1 活性及 IL-10 mRNA 的影响

EMSA 图像显示, 经 PD98059 作用后, AP-1 的活性较单纯烫伤后 12 h 显著减弱(图像未提供)。RT-PCR 图像表明, 烫伤后 12 h IL-10 mRNA 的表达量较正常明显降低, 而 PD98059 组与伤后 12 h 相比基本一致, 3 次结果基本相似, 见图 3。

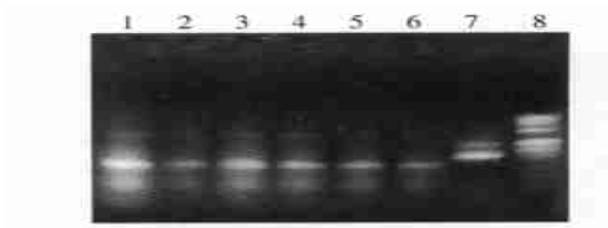


图 3　不同调控剂对严重烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内 **IL-10 mRNA** 表达的影响

Fig 3　Effect of different regulators on IL-10 mRNA expression of murine peritoneal macrophages after severe burns

1: Normal control; 2: Single burns; 3: Burns+ PNS; 4: Burns+PDTC; 5: Burns+ H-7; 6: Burns+ PD98059; 7: β-actin; 8: DNA Marker

3　讨论

3.1　严重烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞 IL-10 mRNA 表达的变化

IL-10 又称细胞因子合成抑制因子, 主要由 TH_2 细胞生成。人和小鼠的 IL-10 在氨基酸水平有 73%的同源性, 在核酸水平高达 81%。IL-10 也可由单核/巨噬细胞生成, 通过其负反馈调节可抑制巨噬细胞本身生成细胞因子(如 TNF、IL-1、IL-6、GM-CSF 等), 抑制致死性的内毒素血症, 发挥抗炎作用, 并下调 MHC Ⅱ类分

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

子及某些协同刺激分子(如 B_7)的表达,从而抑制巨噬细胞的抗原提呈功能[2]。严重烫伤后巨噬细胞 IL-10 mRNA 表达水平呈下降趋势,至 12 h 已显著降低,而 TNF-α 的水平呈上升趋势,至 12 h 达到高峰。表明严重烫伤后 12 h 内,致炎因子 TNF-α 与抗炎因子 IL-10 严重失衡。在伤后 24 h 及 48 h 时,随着 IL-10 mRNA 的回升,逐步发挥其抑制巨噬细胞生成 TNF-α 的效应,致使 TNF-α 的蛋白质及 mRNA 水平均呈下降趋势(另文待发表)。因此,烧伤后早期 TNF-α 的过量分泌与 IL-10 的严重失衡可能为全身炎症反应综合征及多器官功能衰竭的发生机制之一,故早期运用免疫调理剂具有重要意义。

3.2 烫伤后巨噬细胞内 AP-1 活性的变化及 PD98059 的调控

活化蛋白-1(AP-1)由 Fos/Jun 异源二聚体或 Jun/Jun 同源二聚体构成,c-Jun/c-Fos 组成的 AP-1 为最常见形式,介导细胞的增殖、分化及炎性细胞因子表达。该转录因子属于丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)的亚型——$ERK_{1/2}$、JNK、P38 的共同作用的底物之一。ERK 通路(途径)为细胞外信号转导至核内的重要通路之一。标准的传导模式为 Ras 或 PKC→Raf-1→$MEK_{1/2}$→$ERK_{1/2}$→底物蛋白磷酸化[3]。其中 $ERK_{1/2}$ 可使 AP-1 的 C-Jun 的丝氨酸 Ser 63 Ser 73 位点磷酸化[3],因此,AP-1 为 ERK 通路中重要的转录因子之一。严重烫伤后,小鼠腹腔巨噬细胞内 AP-1 的活性与正常对照相比,于伤后 2 h 活化、6 h 活性达到高峰,以后逐步下降,48 h 已接近正常,表明伤后巨噬细胞内 MAPK 信号途径被激活。经 $MEK_{1/2}$ 特异性抑制剂 PD98059 作用后,AP-1 的活性受到显著抑制,这也间接证实了 AP-1 为 ERK 的作用底物之一(图像未提供)。

在人的 IL-10 启动子上无 κB 位点,而有 AP-1 的结合位点,故 NF-κB 不参与 IL-10 的调控,而 MAPK 通路可能参与 IL-10 的生成[4,8]。Foey 等[4]实验表明,在人的外周血单核细胞中,给予 p38 阻断剂 SB203580 可有效地抑制 IL-10、IL-1β、TNF-α 的生成,而用 PD98059 抑制 P42/44 MAPK 则稍稍减少 TNF-α、IL-1β 的表达,对 IL-10 无影响,故有理由认为,IL-10 由 P38 MAPK 所介导,ERK 途经不参与。另有人用 MEK 阻断剂 Ro092210 等方法发现,IL-10 mRNA 由 JNK 或/和 P38 所调控,而给予 PD98059 后,IL-10 mRNA 无变化[8]。我们的实验结果 3 次均显示,PD98059 组的 IL-10 mRNA 的表达与单纯烫伤组相比无明显变化,故 ERK 通路可能不参与烫伤后小鼠腹腔巨噬细胞内 IL-10 mRNA 的表达。因此,我们可以推论,P38、JNK 信号通路可能参与了 IL-10 mRNA 的调控。

参考文献:

[1] 陈仕林,张贞乾,王俊义. 创伤后机体吞噬细胞的功能变化[J]. 国外医学:创伤与外科基本问题分册,1994,15(2):143-147.

[2] Gerard C, Bruyns C, Marchant A, *et al*. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endoto-xemia[J]. J Exp Med, 1993, 177(2): 547-550.

[3] Seger R, Krebs E G. The MAPK signaling cascade[J]. FASEB J, 1995, 9(9): 726-735.

[4] Foey A D, Parry S L, Williams L M, *et al*. Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-α: role of the P38 and P42/44 mitogen-activated protein kinases[J]. J Immunol, 1998, 160(2): 920-928.

[5] Autenrieth I B, Bucheler N, Bohn E, *et al*. Cytokine mRNA expression in intestinal tissue of interleukin-2 deficient mice with bowel inflammation[J]. Gut, 1997, 41(6): 793-800.

[6] Andrews N C, Fallor D V. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(9): 2 499.

[7] 王 勇,黄文华. 一种改进的核转录因子的电泳迁移率改变分析法[J]. 第三军医大学学报,2001,23(1):119-120.

[8] Bruggen T V, Nijenhuis S, Ruaij E V, *et al*. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the Raf-1/MEK1-MEK1/ERK1-ERK2 pathway[J]. Infect Immun, 1999, 67(8): 3 824-3 829.

(编辑 陈聪连)

(上接 701 页)

CAA 缓解或基本治愈患者,SCF 明显升高,基本达到正常水平,说明基质细胞或造血微环境的改善早于造血恢复,造血微环境的恢复,为造血干/祖细胞准备了合适的"土壤",而此时仍有造血缺陷,则提示可能有造血干细胞质的异常[4]。

检测 AA 患者 SCF 水平的临床意义:初诊或治疗无效的 CAA 患者 SCF 水平显著下降,似乎提示对 AA 诊断有一定协助作用,但我们所观察的 CAA 患者 SCF 变化范围较大,有相当一部分与正常对照组值重叠,所以,SCF 用于诊断 AA 灵敏度较差,且 MDS 患者亦可见血清 SCF 水平较低,故 SCF 对 AA 诊断的特异性也不高,所以,SCF 不宜作为 AA 的诊断性指标。CAA 的 SCF 似乎可以对病情转归、预后判断起一定作用,缓解或基本治愈的 SCF 已有明显升高,也有人发现,较高的 SCF 水平,病人则有较好的临床状况:生存期长、造血恢复快、输血依赖不超过 1 个月。

SCF 水平高低与采用免疫抑制剂治疗效果无明显相关[3],我们所观察的 60 例 CAA 患者,不能发现 SCF 水平与治疗效果的关系,因为大都采用常规方案治疗,且一部分病人没有长期随访。SCF 能否用于 AA 患者的治疗,何时应用能起到治疗作用,仍有待临床试验。

关键词:再生障碍性贫血;干细胞因子
中图法分类号:R556.504 文献标识码:B

参考文献:

[1] 张之南 主编. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社,1998. 33-39.

[2] Wodnar-Filipowicz A, Yancik S, Moser Y, *et al*. Levels of soluble stem cell factor in serum of patients with aplastic anemia[J]. Blood, 1993, 81(12): 3 259-3 264.

[3] Kojima S, Matsuyama T, Kodera Y. Plasma levels and production of soluble stem cell factor by marrow stromal cells in patients with aplastic anaemia[J]. Br J Haematol, 1997, 99(2): 440-446.

[4] Novitzky N, Jacobs P. In aplastic anemia progenitor cells have a reduced sensitivity to the effects of growth factors[J]. Eur J Haematol, 1999, 63(3): 141-148.

(编辑 王 红)

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