DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.001
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

文章编号:1000-5404(2000)11-1019-04

论著

创伤小鼠核转录因子 AP-1 活性及 IL-2 表达变化

罗 艳,梁华平,胡承香,徐 祥,王正国 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第一研究室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨创伤后脾细胞核转录因子激活蛋白-1(Activator protein-1,AP-1)的DNA结合活性和IL-2表达的动态变化及它们间的关系。方法 采用小鼠双后肢闭合性砸伤+骨折模型,于创伤后6、12 h,1、4、7、10、14 d处死动物,分离脾细胞,经ConA刺激细胞后收集培养上清以测定IL-2活性;提取脾细胞RNA以测定IL-2 mRNA;提取脾细胞核蛋白,用电泳迁移率改变试验(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)检测AP-1的DNA结合活性。结果 与正常对照组相比,创伤后IL-2活性、IL-2 mRNA均有不同程度的降低,其受抑的程度在创伤后4 d更为明显。创伤后脾细胞AP-1的DNA结合活性亦逐渐下降,至伤后4d时下降最明显,仅为正常对照组的49%。这与创伤后脾细胞IL-2的活性和IL-2 mRNA的降低相一致。结论 创伤后脾细胞IL-2表达受抑至少部分是由于核转录因子AP-1的DNA结合活性降低所导致,表明AP-1参与介导了创伤后IL-2受抑的分子机制。

关键词:创伤;IL-2;IL-2 mRNA;AP-1;核转录因子
中图法分类号:R392.1;R641 文献标识码:A

Activity of activator protein-1 and expression of IL-2 in spleen lymphocytes of mice after trauma

LUO Yan, LIANG Hua-ping, HU Chen-xiang, XU Xiang, WANG Zheng-guo (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the binding activity of nuclear transcription factor, activator protein-1 (AP-1) and the expression of IL-2 in spleen lymphocytes of mice after trauma. Methods Trauma models were established by closed impact injury with fracture on both hind limbs in mice. The animals were sacrificed at the 6 and 12 h and on the 1, 4, 7, 10 and 14 d after the injury. Spleen lymphocytes were isolated from traumatized mice and stimulated with Con-A. The supernatant was harvested and assayed for IL-2 activity. Total RNA was extracted from spleen lymphocytes and assayed for IL-2 mRNA. The DNA binding activity of AP-1 in these cells was measured by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Results The expression of IL-2 and IL-2 mRNA in spleen lymphocytes were decreased in traumatized mice compared with those in control mice, and the decrease was most obvious on the 4th d after injury. The DNA binding activity of AP-1 in the cells were gradually decreased, and the minimum was only 49% of the control on the 4th d after injury, which was closely associated with the decline of IL-2 activity and IL-2 mRNA. Conclusions These results suggest that the inhibition of IL-2 expression partly results from the declined DNA binding activity of AP-1 in traumatized mice. AP-1 takes part in the molecular mechanism of the inhibitory IL-2 expression after trauma.

Key words: trauma; IL-2; IL-2 mRNA; activator protein-1; nuclear transcription factor

大量研究证实,严重创伤可致机体的免疫功能受抑,其中T细胞介导的细胞免疫功能受抑现象表现最为突出[1,2]。白细胞介素-2(IL-2)是T细胞的主要生长因子,创伤后T细胞功能受抑主要是IL-2生成不足所致。可见深入研究IL-2受抑的机制可望成为揭示创伤后T细胞功能受抑发生机制的重要突破口。目前认为,IL-2基因的转录是T细胞活化过程中的重要表现。

基金巷目:国家"973"重点基础研究项目(G1999054203),国家自然科学基金资助项目(39870828)及全军医药卫生科研基金资助项目(99-2001)
作者简介:罗 艳(1963—),女,四川省达州市人,硕士,助理研究员,主要从事创伤感染和创伤免疫方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68757431
收稿日期:2000-08-21;修回日期:2000-10-31

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

现已发现，IL-2基因在转录起始部位的5′端含有一个启动子，而结合到IL-2基因启动子区域的几种转录因子被认为是第二信使与IL-2基因转录调节之间重要的联系环节，这几种转录因子至少包括激活蛋白-1(Activator protein-1，AP-1)、活化T细胞核因子(Nuclear factor of activated T cells，NFAT)、kappa基因结合核因子(NF-kappa B，NFκB)等，它们均可与IL-2基因启动子某些特定的序列相结合，进而高效诱导IL-2基因的转录表达[2]。但其中AP-1(由Fos和Jun蛋白组成的异二聚体)对IL-2基因转录的调节作用日益受到重视，目前有关创伤后AP-1的变化情况国内尚未见报道，因此研究创伤后核转录因子AP-1活性的变化及其与创伤后IL-2表达变化之间的关系，对于揭示创伤后IL-2基因表达受抑的机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及器材

试剂：RPMI 1640培养基(GIBCO BRL)；HEPES、DTT、PMSF、Aprotinin、Leupeptin、PepstainA、Poly(dI-dc)(宝灵曼)；T_4寡核苷酸激酶(Pharmacia)、[γ-^{32}P] ATP(北京市亚辉生物医学工程公司)；Con A(Sigma)；^{3}H-TdR(中国科学院上海原子能研究所)；AP-1双链寡核苷酸探针(Promega)：

5′-d(CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA)-3′

3′-d(GCGAACTACTCAGTCGGCCTT)-5′

器材：24孔、96孔培养板；CO_2培养箱；高速台式离心机(Beckman)；紫外分光光度计(Beckman DU-600)；凝胶干燥仪(上海)；垂直电泳槽、电泳仪、凝胶图像分析系统(BIO-RAD)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及创伤模型制备 健康昆明小鼠，体重(20±2)g，雌雄各半，随机分为以下各组：正常对照组，创伤后6、12 h，1、4、7、10、14 d组。采用小鼠清醒状态下双后肢闭合性砸伤＋双侧股骨骨折[3]。

1.2.2 脾脏细胞的培养与活化 按常法放眼血处死小鼠，无菌获取脾脏制备成细胞悬液，将脾细胞以RPMI 1640培养液调成5×10^6/ml的细胞悬液，加入ConA(10 μg/ml)，于37 ℃、5% CO_2培养箱中孵育24 h后收集培养上清以检测IL-2活性；孵育10 h后收集细胞，以异硫氰酸胍-苯酚-氯仿/异戊醇法提取细胞总RNA以检测IL-2 mRNA。将细胞调至1×10^7/ml浓度，加入ConA(10 μg/ml)活化细胞。于37 ℃，5%CO_2孵箱中培养4 h收集培养板中细胞以提取细胞核蛋白。

1.2.3 IL-2 mRNA测定 从美国ATCC公司获得含重组质粒的大肠杆菌(37553)，参照文献提取和纯化重组质粒DNA，以*BamH*I酶切获取小鼠IL-2 cDNA 1.0 kb片断。cDNA的生物素标记、斑点杂交，显色及扫描测定均参照文献[3]进行，结果以正常对照显色强度的百分比(%)表示。

1.2.4 IL-2活性测定 以CTLL-2细胞株测定[4]。取生长良好的CTLL-2细胞，调细胞浓度1×10^5/ml。于96孔细胞培养板上每孔分别加入：CTLL-2细胞0.1 ml，IL-2标准品或待测样本0.1 ml，于37 ℃，5% CO_2培养箱中培养48 h。加入^{3}H-TdR 20 μl/孔(0.25 μCi/ml)，继续培养8 h，以多头细胞收集仪收获细胞测其Bq值，并以标准品计算样本中IL-2活性。

1.2.5 细胞核蛋白提取 参照文献[5,6]方法改进如下(以下所有步骤均需在冰浴中进行)：将细胞收集于离心管中离心，其沉淀重悬于适量的缓冲液A(10 mmol/L HEPES，pH 7.9；10 mmol/L KCl；1.5 mmol/L $MgCl_2$；1 mmol/L DTT；5%甘油；0.2 mmol/L EDTA；1 mmol/L PMSF；3 mg/L aprotinin；3 mg/L leupeptin；2 mg/L pepstainA；1% NP-40)中孵10 min，离心(14 000 r/min，1 min，0℃)，弃上清液；沉淀重悬于适量缓冲液B(20 mmol/L HEPES，pH 7.9；420 mmol/L NaCl；1.5 mmol/L $MgCl_2$；0.2 mmol/L EDTA；0.5 mmol/L DTT；25%甘油；0.5 mmol/L PMSF；5 mg/L aprotinin；5 mg/L leupeptin；3 mg/L pepstainA)中，混匀，冰浴中置30 min，离心(14 000 r/min，0℃，15 min)。上清即为核蛋白提取液，采用考马斯亮蓝G-250蛋白定量，分装，保存－70 ℃。

1.2.6 EMSA法参照文献[7,8]方法稍加改进 探针标记：AP-1探针经变性后，在T_4寡核苷酸激酶催化下，用[γ-^{32}P] ATP标记探针5′端，经氯仿、苯酚(1∶1)抽提，乙醇沉淀，用TE溶解，－20 ℃保存。

核蛋白与DNA探针结合及电泳(总体积20 μl)：向小管中加入5×连接缓冲液4 μl；poly(dI-dC)1 μg；核提取蛋白10 μg；混匀，冰浴中30 min，然后加入^{32}P-DNA探针1.5 μl，室温下孵育30 min。6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，干胶及放射自显影。

1.3 统计学方法

所有数据用$\bar{x}\pm s$表示，作t检验和相关分析。

2 结果

2.1 创伤小鼠脾细胞IL-2 mRNA及IL-2活性的动态变化

与正常对照小鼠相比，创伤各组小鼠IL-2活性、IL-2 mRNA均有不同程度的降低，二者呈非常显著的相关(r=0.77，P<0.01)。其受抑的程度在创伤后4 d更为明显，见表1。

表1 创伤小鼠脾细胞IL-2、IL-2 mRNA的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of IL-2, IL-2 mRNA in traumatized mice splenocyte($\bar{x}\pm s$)

Group	n	IL-2(U/ml)	IL-2 mRNA(%)
Control	6	52±8	100±9
Post wound			
1 d	6	50±6	91±10*
4 d	6	22±7**	51±6**
7 d	6	37±5*	68±5*
10 d	6	41±5	72±8*

*：P<0.05，**：P<0.01 *vs* control

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

2.2　EMSA 法检测 AP-1 的 DNA 结合活性的变化

图 1 为创伤后不同时相点小鼠脾细胞 AP-1 的 DNA 结合活性变化的 EMSA 放射自显影结果, 条带 1 为竞争性抑制条带(加入 100 倍浓度的冷探针), 条带 2 为非竞争性抑制条带(加入 100 倍浓度的无关探针), 提示本方法是特异的。创伤后不同时相点的电泳滞后带经图像扫描仪进行密度扫描。采用凝胶图像分析系统测定其灰度值和滞后带面积, 二者的乘积表示核提取物中 AP-1 与标记探针结合的活性。随创伤时间延长, 其 DNA 结合活性逐渐下降, 至伤后 4 d 时下降最明显, 仅为正常对照组的 49%, 伤后 14 d 时恢复。

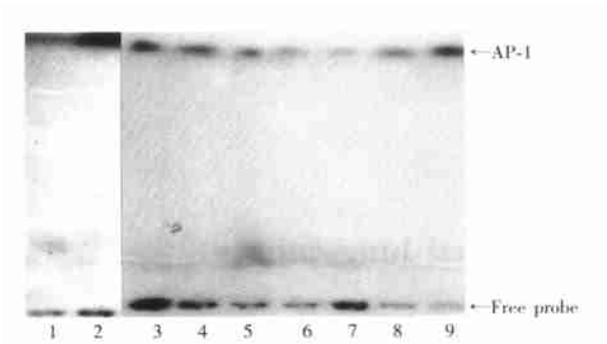


图 1　EMSA 法分析创伤后 AP-1 活性变化

Fig 1　Activation of AP-1 after trauma by EMSA

Competitor and non-competitor (lane 1 and lane 2); Control (lane 3); 6 h (lane 4); 12 h (lane 5); 1 day (lane 6); 4 days (lane 7); 7 days (lane 8); 14 days (lane 9)

3　讨论

创伤后活化 T 细胞 IL-2 mRNA 及蛋白质水平降低是导致 T 细胞功能受抑的重要原因, 并与创伤后多项细胞免疫功能指标降低呈正相关关系。以往有关创伤后 IL-2 受抑的发生机制的研究主要集中在: (1)神经—内分泌—免疫网络紊乱; (2)"抑制性因子"的产生; (3)"抑制性细胞"的出现等三个方面; 但尚未形成一种系统完善的学说。近年来, 有关创伤后 IL-2 受抑的分子机制研究正日益受到重视。Horgan 等[1]发现烧伤小鼠脾细胞经有丝分裂原 ConA 刺激后, IL-2 mRNA 水平低于正常对照, 利用细胞核 run-on 试验, 证实烧伤小鼠脾细胞 IL-2 的基因转录降低, 而 IL-2 mRNA 动力学变化与正常无异, 由此认为烧伤后 IL-2 mRNA 降低并非由 mRNA 降解增加所致, 其受抑过程发生在转录前水平。本研究动态检测了创伤后 IL-2 活性和 IL-2 mRNA 的变化, 发现创伤后 IL-2 活性和 IL-2 mRNA 降低, 且创伤后 IL-2 的变化规律同 IL-2 mRNA 相一致, 二者变化关系密切。可见创伤确可抑制 IL-2 的基因表达, 创伤后淋巴细胞 IL-2 mRNA 的降低是导致 IL-2 产生减少的重要原因, 这表明创伤后 IL-2 在转录水平就已受到了抑制。但 IL-2 基因转录降低的发生机制则远未阐明。

我们发现创伤小鼠脾细胞及分离纯化的 T 细胞中 cAMP 含量升高、cGMP 及三磷酸肌醇(IP_3)含量减少、游离钙(Ca^{2+})浓度、钙调素(CaM)、CaM 依赖的蛋白激酶(CaM-PK)及蛋白激酶 C(PKC)活性降低, 提示创伤后淋巴细胞及活化 T 细胞内信号传导异常, 这可能是导致 IL-2 基因转录表达受抑的重要原因[3]。核转录因子是联系细胞内第二信使分子与 IL-2 基因转录的中介, 活化细胞多种信号转导途径的启动是核转录因子生成的前提, 而 IL-2 基因转录表达又有赖于核转录因子与 IL-2 基因启动子区域的结合。已知在与 IL-2 基因转录相关的核转录因子中, NFAT 的作用比较重要, 它是由 NFATp 亚基、Fos 和 Jun 蛋白组成的异三聚体, 对于 IL-2 基因的转录是必需的。但近年来 AP-1 (由 Fos 和 Jun 蛋白组成的异二聚体)对 IL-2 基因转录的调节作用日益受到重视, 这是因为 AP-1 组成成分 Fos 和 Jun 蛋白也是 NFAT 必不可少的组成成员, 而且由 NFAT 介导的 IL-2 启动子的转录活化依赖于 AP-1 的存在[2]。有学者证实, AP-1 共有序列的缺失可使 IL-2基因启动子的活性降低 90%[3], 该结果足以说明 AP-1在诱导IL-2基因转录方面的重要性。

因此本研究用电泳迁移率改变法(EMSA)检测了创伤后脾细胞核内 AP-1 的 DNA 结合活性的变化, 发现创伤后其 DNA 的结合活性逐渐降低, 至伤后 4 d 时下降最明显, 仅为正常对照的 49%, 伤后 14 d 时恢复, 这与创伤后脾细胞 IL-2 活性和 IL-2 mRNA 的降低相一致, 二者变化关系密切。因此可以认为创伤后 IL-2 表达受抑至少部分是由于核转录因子 AP-1 的 DNA 结合活性降低所导致, 这对于揭示创伤后 IL-2 基因表达受抑的机制具有重要意义。

参考文献:

[1] Horgan A F, Mendez M V, O'Riordain D S, *et al*. Altered gene transcription after burn injury results in depressed T lymphocyte activation[J]. Ann Surg, 1994, 220(3): 342—352.

[2] Ronald L, Whisler L B, Ming C. Aged-related decreases in IL-2 production by human T cells are associated with impaired activation of nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT[J]. Cell Immunol, 1996, 169: 185—195.

[3] 梁华平, 王正国, 耿　波, 等. 创伤后巨噬细胞对 T 细胞白介素 2 及白介素 2 受体 α 基因表达的直接接触抑制作用[J]. 细胞生物学杂志, 1995, 17(2): 86—88.

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

[4] 刘靖华, 陈惠孙, 胡德耀, 等. 创伤-失血性休克对机体免疫功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(1): 81—84.
[5] Dignam J D, Lebovitz R M, Roeder R G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase Ⅱ in a soluble extract from isolated mammalian nuclei[J]. Nucleic Acids Res, 1983, 11(5): 1 475—1 489.
[6] Pahlavani M A, Harssis M D, Richardson A. The increase in the induction of IL-2 expression with caloric restriction is correlated to changes in the transcription factor NFAT[J]. Cell Immunol, 1997, 180(1): 10— 19.
[7] Samy T A, Ayala A, Catania R A, *et al*. Trauma-hemorrhage activates signal transduction pathways in mouse splenic T cells [J]. Shock, 1998, 9(6): 443— 450.
[8] Mondino A, Whaley C D, Desilva D R, *et al*. Defective transcription of the IL-2 gene is associated with impaired expression of c-Fos, FosB, and JunB in anergic T helper 1 cells[J]. J Immunol, 1996, 157(5): 2 048— 2 057.
[9] 梁华平, 王正国, 朱佩芳, 等. 创伤后 T 细胞功能受抑与信号转导变化的关系[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(7): 525— 528.

(编辑 薛国文)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)11-1022-01

57 例晚期肺癌患者肺部真菌感染分析

Analyses of fungus infection in 57 cases of terminal lung cancer

谢 怡 (云南省肿瘤医院中西医结合科, 昆明 650106)

晚期肺癌患者常并发肺部感染, 由于抗肿瘤化、放疗的应用及广泛使用广谱抗生素, 使机体免疫力下降, 机体微生态失衡, 条件致病菌性真菌得以大量繁殖而引起真菌感染。现对我科 1998 年 6 月至 2000 年 6 月收治的 57 例晚期肺癌患者的肺部真菌感染情况作一回顾性分析。

1 材料与方法

1.1 病例选择

全组病人为 1998 年 6 月至 2000 年 6 月收治的晚期肺癌患者 57 例, 其中男 52 例, 女 5 例; 年龄 36~72 岁, 中位年龄 60 岁, ≥60 岁共 38 例; 肺鳞癌 26 例, 小细胞肺癌 1 例, 肺腺癌 9 例, 腺鳞癌 2 例, 未分型 19 例; ⅢA 期 4 例, ⅢB 期 21 例, Ⅳ期 32 例。本组患者诊断为阻塞性肺炎者 42 例(73.68%), 接受化疗者 40 例(70.17%), 其中化疗 1 周期者 19 例(33.33%), ≥2 周期者 21 例(36.84%), 使用单药者 14 例, 二药联用者 16 例(40.00%), 三药联用者 20 例(50.00%); 接受放疗者 43 例(75.44%), 放疗剂量 45~60 Gy; 使用抗生素者 57 例(100%), 使用时间均≥3 周, 多用头孢类和(或)喹诺酮类等广谱抗生素, 使用 2 种或 2 种以上抗生素者 43 例(75.44%); 该组患者 CD4/CD8 下降者 45 例(78.95%)。

1.2 肺部真菌感染诊断标准

采用 3%过氧化氢溶液漱口后咳出痰标本(不用头一两口痰), 连续 2 次以上培养出同种真菌, 并结合临床表现方可确诊[1]。

2 结果

57 例患者诊断为肺部真菌感染者 19 例, 真菌感染率为 33.33%(19/57)。本组患者真菌感染相关因素分析。表明, 肺部真菌感染与性别、年龄及放疗无关($P>0.05$), 但与并发阻塞性肺炎、化疗、化疗周期的长短, 化疗+放疗, 抗生素多药联用, CD4/CD8 下降有关($P<0.05$)。真菌感染者 19 例, 真菌感染组中死亡 11 例, 死亡率 57.89%; 非真菌感染组死亡 9 例(23.68%)。真菌感染组死亡率明显高于非真菌感染组($P<0.05$), 说明肺部真菌感染增加了晚期肺癌的死亡率。

3 讨论

机体对霉菌有较强的抵抗力, 霉菌对人体的致病力呈条件性、机会性侵害, 其发生发展取决于: 霉菌的特异性和接触的数量, 宿主的免疫功能状态, 环境条件中影响宿主与霉菌之间的关系[2]。真菌侵入机体刺激机体产生特异性免疫, 以细胞免疫为主。患恶性肿瘤或应用免疫抑制剂导致细胞免疫功能低下者, 易发生霉菌感染[3]。该组患者均为晚期肺癌, 采用化疗和化疗+放疗, 使机体免疫功能进一步下降。使用多个周期化疗较使用 1 周期化疗者, 机体的免疫功能受到更严重的抑制。因此, 化疗组、化疗+放疗组、≥2 个周期化疗组其肺部真菌感染率明显增高, CD4/CD8 下降是免疫缺陷的 1 个重要指标, 本组资料表明, CD4/CD8 下降组肺部真菌感染率明显增高。单用放疗组其肺部真菌感染率无明显增高, 局部抗肿瘤治疗放疗一般较

(下转 1025 页)

作者简介: 谢 怡(1965—), 女, 重庆市人, 主治医师, 主要从事中西医结合治疗晚期肺癌方面的研究。电话: (0871)8185653-2049

收稿日期: 2000-09-10; 修回日期: 2000-11-02

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