DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.08.005
第22卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 8
724 2000年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)08-0724-03

烧伤后肠系膜淋巴结 GP130 基因表达与细胞凋亡

白晓东[1],刘贤华[2],肖光夏[1] (第三军医大学:[1]附属西南医院烧伤研究所;[2]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所;重庆 400038)

提 要:目的 观察烧伤后肠系膜淋巴结GP130基因表达与细胞凋亡变化的时相关系。方法 BALB/c种小鼠60只,分为致伤组、正常对照组。致伤组动物予以20%TBSA Ⅲ度烧伤。于伤后1、2、3 d活杀致伤组,并活杀对照组。取肠系膜淋巴结:ELISA检测IL-6水平;提取RNA,RT-PCR检测GP130基因表达变化;采用TUNNEL法对细胞凋亡进行观察。结果 在伤后3 d以内IL-6含量明显升高;GP130基因表达、细胞凋亡在伤后1d明显增加。结论 在烧伤后早期,肠系膜淋巴结IL-6、GP130表达与细胞凋亡均增加。

关建词:烧伤;IL-6;IL-6受体;GP130;细胞凋亡
中图法分类号:R329.25;R644 文献标识码:A

Expression of GP130 in mesenteric lymph node and its relationship with cell apoptosis after burn injury in mice

BAI Xiao-dong, LIU Xian-hua, XIAO Guang-xia (Research Institute of Burn Injury, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the change of IL-6R GP130 gene expression in mesenteric lymph nodes (MLN) after burns and its relationship with cell apoptosis. Methods Sixty mice were devided into control group and injury group. In the injury group, animals were inflicted with 20% TBSA full thickness burns. On 1 d, 2 d and 3 d after burns, mice were killed, and the mesenteric lymph nodes were taken. IL-6 were measured with ELISA. Isolated cells from the mesenteric lymph nodes were examined with RT-PCR to observe the expression of GP130 gene. Meanwhile cell apoptosis was investigated with "TUNNEL" staining. Results IL-6 was increased on 3 d after burns, Expression of GP130 and cell apoptosis were increased on 1 d after burns. Conclusion In the early period postburn, expression of IL-6 and GP130 are increased, so does cell apoptosis.

Key words: burns; IL-6; IL-6R; GP130; apoptosis

IL-6是调节细胞分化、抑制细胞凋亡的主要因子,IL-6受体由二个亚基构成[1],α亚基及β亚基。前者为GP80蛋白,后者为GP130蛋白。α亚基存在于膜上,负责与IL-6分子结合;GP130主要部分在胞内。当α亚基与IL-6分子结合后,必须与GP130耦联才能激发信号传递。其次,IL-6与SIL-6R(GP80)结合后亦可激活GP130而产生效应。因此GP130是重要的功能亚基,是多种细胞因子共用的一个信号传递分子。目前有关烧伤后肠系膜淋巴结内细胞凋亡以及GP130表达如何变化,尚无文献报道。本研究采用RT-PCR对伤后肠系膜淋巴结内GP130的基因表达及其与细胞凋亡的时相关系进行观察,以初步阐明烧伤后粘膜免疫的变化机制。

1 材料和方法

1.1 试剂

RNA提取试剂盒、RNase-抑制剂、dNTP购自Boehringer Mannheim公司;反转录引物:Oligo(dT)15引物、AMV逆转录酶购自Promega公司;Taq聚合酶购自上海生工公司。

1.2 RT-PCR引物设计及合成

采用如下序列[2],引物由上海生工公司合成,并经纯化。

GP130:扩增长度为687 bp。5'-primer CAGCGTACACTGATGAAGGTGCGAAAGA;3'-primer GCTGACTGCAGTTCTGCTTGA

作者简介:白晓东(1969—),男,山西省太原市人,博士,主治医师,讲师,主要从事烧伤感染方面的研究,发表论文12篇。电话:(023)68754578

收稿日期:1999-12-05;修回日期:2000-05-09

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

GAPDH: 扩增片段长度为 934 bp。5'-primer TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC; 3'-primer CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC

1.3 动物分组及致伤

BALB/c 健康雄性小鼠 60 只, 22 g 左右, 5 周龄。随机分为对照组及致伤组。致伤组动物经背部剃毛后, 经 3% 凝固汽油燃烧 7 s, 给予 20% Ⅲ度 TBSA 烧伤。分别于伤后 1、2、3 d 分批活杀致伤组动物。动物取材: 活杀小鼠, 无菌打开腹腔, 取肠系膜淋巴结(Mesenteric lymph nodes, MLN)。每个时间点 5 只小鼠的 MLN 用于 RT-PCR; 另外 10 只的 MLN 一半制成病理切片、一半用于 IL-6 测定。

1.4 MLN 细胞 RNA 提取

同时间点 5 只小鼠的 MLN 归集一处, 过 200 目不锈钢网, 成单细胞, 离心收集。采用常规方法提取 RNA, 备用。

1.5 RT-PCR 反转录

按下列顺序加样: 5× RT Buffer, 4 μl; dNTP, 2 μl; Oligo(dT) 1 μl; 提取 RNA, 1.5 μl(约 1 μg); 1% DEPC, 10 μl; 在 PCR 仪上, 68 ℃, 5 min, 冰浴 3 ~ 5 min, 加入 0.5 μl RNAase 抑制剂, 1 μl AMV 酶, 在 42 ℃水浴中 2 h。95 ℃, 5 min, 5 ℃, 5 min, 产物于 −20 ℃冻存备用。

反转录产物 PCR: 按下列顺序进行: 反转录产物(CDNA)2 μl; 10× Buffer 5 μl; 25 mmol/L $MgCl_2$ 3 μl; dNTP, 3 μl; GP130 5'-引物 1 μl; GP130 3'-引物 1 μl; 双蒸水 34 μl; 97 ℃, 6 min, 冰浴 5 min, 加 Taq 酶 1 μl; 97 ℃, 90 s; 60 ℃, 60 s; 72 ℃, 80 s, 30 循环; 72 ℃, 延长 7 min; GAPDH 与 GP130 同时扩增。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖胶中, 50 V, 电泳。设立 GAPDH 参照, 各时相逆转录产物在用 GP130 引物 PCR 扩增同时, 亦用 GAPDH 的引物扩增, 二者除引物外, 其余条件均完全一致。阴性对照: PCR 扩增时, 不加特异引物, 其余与上述条件完全一致。

1.6 RT-PCR 半定量

将电泳结果在本所四星电泳分析仪上测定, 以 GP130/GAPDH 的灰度计数值之比为结果。

1.7 MLN 中 IL-6 测定

称重, 入 2 ml 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 中匀浆。匀浆液中 IL-6 测定按 ELISA 试剂盒中步骤进行。

$$\omega(\text{IL-6}) = \frac{\text{匀浆液 IL-6(ng/ml)} \times 2\ \text{ml}}{\text{MLN 重量(g)}}$$

1.8 肠系膜淋巴结中细胞凋亡观察记数

采用"TUNNEL"法。MLN 常规制病理石蜡切片, 按试剂盒说明的步骤进行染色。阳性细胞记数: 计数 400 倍视野中的阳性细胞数, 每个时间点共随机观察 50 个视野, 计算平均数。

1.9 统计学分析

采用 t 检验进行组间比较。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 MLN 细胞膜受体 GP130 表达

对照组中 GP130 保持一定量的表达。烧伤后各时相均见 GP130 表达, 见图 1。GP130/GAPDH: 对照组为 1.26±0.11, 致伤后 1 d 为 6.07±0.22($P<0.05$ vs control), 2 d 为 3.65±0.31($P<0.05$ vs control), 3 d 为 1.19±0.18。

2.2 MLN 中 IL-6

对照组为(138.89±108.78) ng/g, 伤后 IL-6 水平明显升高, 1 d 为(653.14±258.71) ng/g, 2 d 为(435.7±207.6) ng/g, 3 d 为(2 121.09±1 085.78) ng/g, 均明显高于对照组($P<0.05$)。

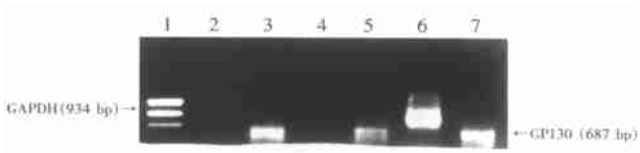


图 1　致伤组各时相 RT-PCR 结果

Fig 1　Result of RT-PCR of injury group at different time points

Lane 1: PCR marker; Lane 2: GAPDH on 1 d; Lane 3: GP130 on 1 d; Lane 4: GAPDH on 2 d; Lane 5: GP130 on 2 d; Lane 6: GAPDH on 3 d; Lane 7: GP130 on 3 d

2.3 MLN 中细胞凋亡计数

每个视野凋亡细胞数对照组为 75.68±8.41, 见图 2。致伤后 1 d 为 102.40±70.79, 2 d 为 10.24±2.95, 3 d 为 11.84±1.31, 与对照组差异显著($P<0.05$)。

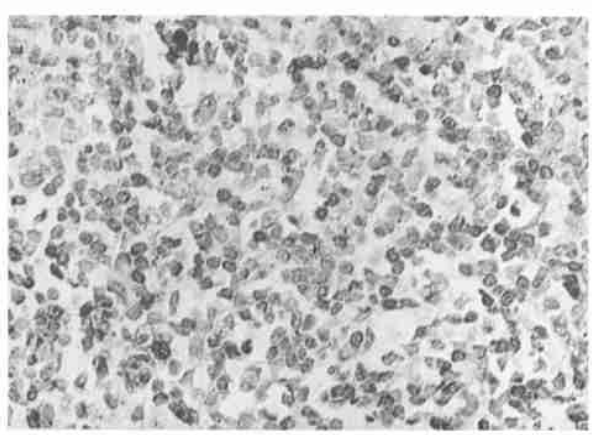


图 2　肠系膜淋巴结中细胞凋亡　(TUNNEL 染色×200)

Fig 2　Cell apoptosis in MLN　(TUNNEL stain× 200)

3 讨论

在 GALT 中, IL-6 起着不可缺少的作用, 如果将 IL-6 基因从小鼠体内剔除, GALT 则不能产生相应高水平的 IgA 抗体应答, 同时 IgA 型浆细胞在 MLN、小肠、肺部的数量明显减少。然而 IL-6 所表现出的作用特性, 在很大程度上依靠其靶细胞膜上的 IL-6 受体的功能。IL-6R 是由两条跨膜糖蛋白 α 亚基和 β 亚基组成, 前者分子量 80 000, 负责与配体 IL-6 的结合, 以及负责与 β 亚基的耦联, β 亚基即 GP130, 分子量为 130 000, 主要

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

参与信号传导。IL-6 结合 GP130 的途径有二条：①IL-6 与 GP80 在膜上结合，然后与 GP130 耦联，将信号传递入胞内；②IL-6 与胞外 SIL-6R（可溶性 IL-6R，主要为 GP80 的胞外部分）结合，直接与 GP130 结合，启动信号传递。因此，GP130 是 IL-6 传递信号中的关键环节。

最近有作者提出，体内持续高水平的 IL-6 可导致 GP130 表达减少[3]。有关烧伤后淋巴细胞膜表面 IL-6R 的表达变化的研究较少，在应激状态时，血浆中 IL-6 及 SIL-6R 的水平往往呈同步上升趋势[4]。因 SIL-6R 主要来源于 α 亚基的胞外部分（GP55）。从而提示病理状态下，IL-6 升高同时合并 α 亚基表达增多。但是有关烧伤后 GP130 表达，特别是 GALT 中的表达变化，尚未见研究报道。本研究证实烧伤后 IL-6 升高并未抑制 β 亚基即 GP130 的基因表达：MLN 中 IL-6 在 1、2、3 d 均高于伤前水平，而 GP130 主要在 1 d 增高，3 d 则恢复至伤前水平。IL-6 的生物活性之一为抑制细胞凋亡，IL-6 通过其受体起调控作用。但是伤后 1 d，即使 IL-6、GP130 表达增加，细胞凋亡仍增加，提示伤后 1 d MLN 中存在导致凋亡增加的其它可能因素，其促进凋亡增加、从而导致局部免疫功能紊乱。在伤后 2、3 d，IL-6 通过其受体在一定程度上抑制了细胞凋亡的发生，使凋亡细胞数量减少。

参考文献：

[1] 董家新，任蕴芳，沈倍奋. IL-6 受体结构与功能的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展，1995，22(3)：194－197.
[2] Song C L, Yamte T, Taguchi Y, *et al*. Regulation of the gp80 and gp130 subunits of the IL-6 receptor by sex steroids in the murine bone marrow[J]. J Clin Invest, 1995, 100(6): 1 980－1 990.
[3] Wang X J, Taga T, Yoshida K, *et al*. gp130, the cytokine common signal-transducer of IL-6 cytokine family, is downregulated in T cells *in vivo* by IL-6[J]. Blood, 1998, 91(9): 3 308－3 314.
[4] Barak V, Schwartz A, Kalickman I, *et al*. Prevalence of hypophosphatemia in sepsis and infection: the role of cytokines[J]. Am J Med, 1998, 104(1): 40－47.

（编辑 陈聪连）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)08-0726-01

276 例创伤病人输血分析

Analysis of blood transfusion in 276 traumatic patients

陈方祥，马贵山，何 静，陈 钧 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所输血科，重庆 400042）

我院 1995～1998 年收治创伤出血病人 276 例，现将围手术期输血输液治疗情况分析如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

查阅发血记录本、手术麻醉记录单和病例有关资料，收集创伤出血病人用血量在 1 200 ml 以上者 276 例（男 192 例），年龄平均 36.6 岁。出血量 860～10 600 ml，用血量共计 581 687 ml，其中红细胞制剂 162 283 ml，浓缩血小板 458 U，血浆 18 600 ml，冷沉淀 286 U。术中输液量共计 785 496 ml，平均每例 2 906 ml，其中包括林格氏液、生理盐水、葡萄糖溶液、右旋糖酐等。血型分布：O 型 94 例，A 型 77 例，B 型 72 例，AB 型 33 例。伤情中四肢伤 87 例，腹部伤 66 例，颅脑伤 28 例，胸部伤 26 例，多发伤 39 例，其他 30 例。收集术前、术后 1～3 d 和出院前最后一次检验结果，作统计学分析。

1.2 统计学方法

所有计量资料以 $x \pm s$ 表示，采用配对 t 检验。

2 结果

对检查结果完整的 166 例进行血液学指标分析，发现术后 RBC、Hct、HB 与术前比较差异不显著，Plt 计数显著升高，WBC 计数显著减少。出院前最后一次检查结果 RBC、Hct、Plt 升高非常显著，白细胞计数显著下降。Hb 显著升高，见表 1。

表 1 实验室检查结果（n= 166，$\bar{x} \pm s$）

项目	术前	术后	出院前
RBC(1×10^{12}/L)	3.85±0.94	3.62±0.71	4.11±0.71 **
Hb(g/L)	101±26	95.6±17.3	115±22.0 *
Hct(%)	0.31±0.07	0.30±0.06	0.32±0.06 **
Plt(1×10^{9}/L)	102±51	131±72	193±141 **
WBC(1×10^{9}/L)	12.1±6.5	10.2±5.2	9.1±5.0 **

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ 与术前比较

作者简介：陈方祥（1953－），男，湖北省恩施市人，土家族，硕士，副教授，主要从事自体输血和成份血临床应用方面的研究，发表论文 8 篇。电话：(023)68757281

收稿日期：1999-12-05；修回日期：2000-04-24

（下转 730 页）

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