DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.04.003

白细胞介素-6 mRNA及其蛋白在烧伤复合内毒素血症早期大鼠肝组织中的原位表达*

王晓东** 刘友生 冯俊明 (第三军医大学基础医学部病理学教研室) 重庆, 630038

提 要 目的: 观察 IL-6 mRNA及其蛋白在烧伤复合内毒素血症早期大鼠肝损害中的表达和细胞定位以及探讨 IL-6在其发病过程中的作用。方法: 选用156只 Wistar大鼠随机分为复合组(C)、烧伤对照组(B)、内毒素对照组(E)和正常对照组(N), 应用血清定量、免疫组化(IHC)及原位杂交(ISH)等方法, 检测了烧伤复合内毒素血症大鼠血清 IL-6含量变化、肝组织 IL-6和 IL-6 mRNA的细胞定位及其分布。结果: 血清 IL-6分别在0.5 h、6~12 h出现两个峰值($P < 0.05$), 组织 IL-6主要定位于肝窦内皮细胞(SECs)、枯否细胞(KCs), IL-6 mRNA主要定位于 KCs中性粒细胞(PMNs)、巨噬细胞(MPs)。结论: 提示 IL-6是参与烧伤复合内毒素血症早期肝脏损害的重要细胞因子之一, 并与肝细胞 LBP的合成密切相关。

关键词 灼伤; 内毒素血症; 白细胞介素-6; 脂多糖结合蛋白; 免疫组化; 原位杂交
中图法分类号 R392.12

在烧伤、创伤等致伤条件下, IL-6的作用日益受到重视, 特别是在 IL-6与其它细胞因子的关系、参与急性期蛋白的合成和分泌以及如何启动早期脏器损害等方面成为研究的热点[1]。但是目前在烧伤复合内毒素血症肝脏损害过程中 IL-6和 IL-6 mRNA的原位表达及细胞定位尚未见报道, 本实验拟从不同层次对 IL-6和 IL-6 mRNA在烧伤复合内毒素血症肝组织中的定位与分布进行研究, 并探索 IL-6在早期肝脏损害中的作用和意义。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立

1.1.1 动物分组 健康 Wistar大鼠156只(四川省中药研究所动物中心), 体重230±20 g, 根据以往报道模型[2]随机分为复合组、烧伤对照组、内毒素对照组和正常对照组, 时相点设为0.5、1、3、6、12、24、48和72 h。

1.1.2 动物致伤 复合组于体表造成20% Ⅲ度烧伤后1 μg/g的 E. coli内毒素(Sigma)用1 ml生理盐水稀释腹腔注射, 造成烧伤复合内毒素血症急性肝损害实验动物模型; 烧伤组仅造成20% Ⅲ度烧伤; 内毒素组仅注射等剂量内毒素; 正常对照组于脱毛后腹腔注射等量生理盐水。

1.1.3 标本收集 按各时相点以3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(0.5 ml/只), 腹主动脉抽血, 2500 r/min离心10 min, 分离血清 -20℃冻存备血清学检查, 取肝组织入4%多聚甲醛(DEPC水配)固定12 h, 10%蔗糖漂洗24 h, 常规石蜡包埋切片(玻片经 APES处理)备免疫组化和原位杂交。

1.2 血清 ELISA检测

IL-6血清检测试剂盒购自西安第四军医大学免疫教研室, 具体操作方法按说明书进行。在 DG3022酶联免疫检测仪(由本校西南医院检验科提供)读410 nm A值, 标准曲线由本校数学教研室用指数拟合回归方程绘制($r = 0.993$)得出测定值。

1.3 免疫组化染色

IL-6鼠源单抗购自北京邦定公司(1∶50), ABC试剂盒购自 VECTOR公司(1∶100~200), DAB(含量0.05%)、H_2O_2(显色液含量0.003%)。具体方法参见文献[3]略作修改。

1.4 分子原位杂交

1.4.1 IL-6 cDNA探针的制备 IL-6 cDNA探针重组于 PGEM-3Zf(+)质粒中, 该质粒菌种由西安第四军医大学病理学教研室胡川闽博士提供, 酶切位点 EcoR Ⅰ-Bam HⅠ, 插入片段长度0.56 kb, 采用文献[4]碱变性法提取质粒 DNA, 酶切, 透析袋电泳法回收特异 DNA片段。选用参照 DNA电泳以估算含量(约0.1 g/L)。

1.4.2 地高辛标记探针及检测 按 BM公司探针标记试剂盒说明采用随机引物法(RHP)进行标记及检测。

1.4.3 石蜡切片杂交染色 按文献[4]略作修改, 主要修改步骤如下: 石蜡切片65℃速烤5 min, 彻底脱蜡及梯度酒精处理; 20%乙酸4℃ 20 min去除内源性碱性磷酸酶; 探针浓度1

* 全军"九五"攻关项目分题
** 王晓东, 男, 32岁, 硕士, 实验师

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

mg/L, 42℃杂交 20 h,切片用 DEPC处理的蜡膜复盖;暗处显色 30 min至 1 h,0.5% 甲基绿复染胞核,甘油明胶封片。

1.4.4 对照设置及结果观察 杂交前用 RNase消化和加不含探针的预杂交液切片做阴性对照,杂交阳性细胞为紫蓝或紫黑色,呈胞浆或胞浆胞核型,复染细胞胞核呈淡绿色。

1.5 统计学处理

用 ExceL 5.0版统计分析程序对实验数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组血清 IL-6含量变化

复合组血清 IL-6在 30 min已明显升高 ($P < 0.05$),其峰值在 6~ 12 h, 24 h以后逐渐降至正常水平;烧伤组各时相点与正常对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$);内毒素组在 1、24、72 h显著升高 ($P < 0.05$)。烧伤组在 30 min、12 h其含量显著低于复合组;内毒素组在 30 min、1、3 h其含量显著低于复合组 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 血清 IL-6含量 (ng/L)变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Changes of IL-6 contents in different groups(ng/L) ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Time(h)							
	0.5	1	3	6	12	24	48	72
C	10.39± 0.75**	8.66± 1.82	10.87± 2.06*	11.56± 3.41	11.56± 3.40*	8.02± 1.15	7.83± 0.34	7.50± 0.95
B	7.63± 0.12□□	8.32± 0.93	9.79± 4.00	8.94± 0.83	8.37± 0.73□	8.43± 0.95	9.30± 0.61□□	8.51± 0.67
E	7.96± 0.36□□	9.19± 1.10□*	8.41± 0.57□	8.51± 0.74	9.80± 3.49	10.24± 1.56□*	8.56± 1.42	9.35± 0.95□*

*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$ *vs* normal control group(7.36± 1.39 ng/L);□: $P < 0.05$,□□: $P < 0.01$ *vs* group

2.2 免疫组化染色

复合组 IL-6主要表达在 3~ 24 h,阳性反应较为均质弥散,呈棕黄色,主要定位于肝窦壁,而增生肥大的 KC以及少量 PMN中的阳性表达较为散在,见图 1,部分中央静脉、叶间静脉内皮细胞上也有弱阳性表达。在烧伤组和内毒素组其 TNF-α总体表达相对较弱,正常对照组未见明显的阳性表达,阴性对照切片为阴性反应。

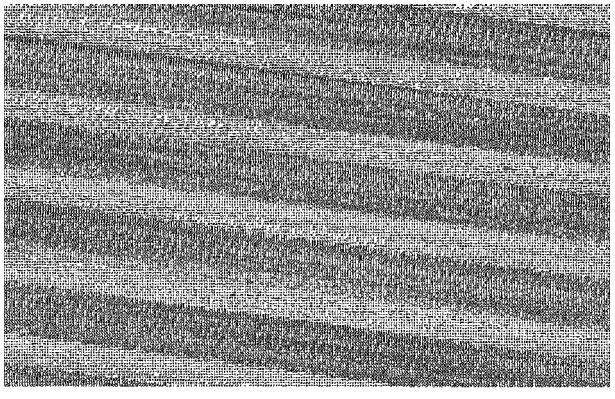


图 1 复合组 6 h肝脏 IL-6定位 (免疫组化× 400)

Fig 1 IL-6 localization in liver at the 6th hour in combined group (IHC× 400)

2.3 原位杂交染色

复合组 IL-6 mRNA主要表达在 1~ 24 h,阳性表达较为广泛均质,呈紫蓝色或紫黑色胞浆胞核型表达。在 1~ 12 h主要定位于 KG、PMN,见图 2,在 SEC未见明显的阳性表达;在 24~ 48 h主要定位于多发性溶解性坏死灶内的 PMN、MP,见图 3;在烧伤组和内毒素组其 IL-6 mRNA阳性表达相对较弱,正常对照组可见少量 KC、单核细胞 (MC)弱阳性表达。杂交设置的阴性对照切片为阴性反应。

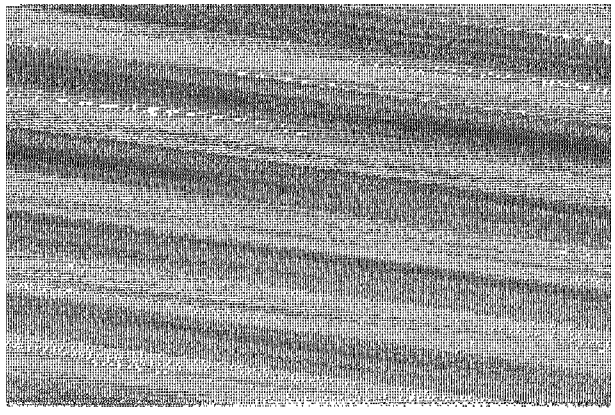


图 2 复合组 12 h肝脏 IL-6 mRNA定位 (原位杂交× 400)

Fig 2 IL-6 mRNA localization in liver at the 12th hour in combined group (ISH× 400)

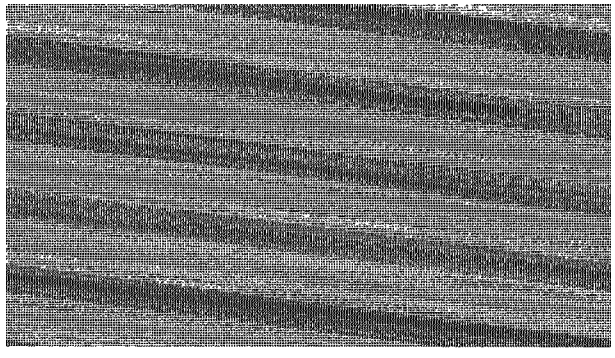


图 3 复合组 24 h肝脏坏死灶 IL-6 mRNA定位 (原位杂交× 400)

Fig 3 IL-6 mRNA localization in hepatic foci at the 24th hour in combined group (ISH× 400)

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

3 讨论

烧伤复合内毒素血症是常见的临床病症,肝脏是烧伤、创伤后三大易感器官之一。我们选用体表烧伤复合腹腔注射内毒素复制类似于人体急性肝损害动物模型,旨在以往研究的基础上侧重在细胞因子与急性期蛋白相互作用与调节方面,从细胞和分子水平探索烧伤复合内毒素血症肝脏早期损害的发生机理,为临床的有效防治提供理论依据。

研究表明,肝细胞受到刺激诱导时可上调脂多糖结合蛋白(LBP)的合成与分泌,它与脂多糖(LPS)、CD14形成三重复合物作用于单核/巨噬细胞,导致IL、肿瘤坏死因子(TNF)等活性物质大量产生,从而催化放大LPS介导的各种反应[5]。其中IL-6是急性期反应的重要细胞因子之一,除正常生理功能外,还参与多种疾病的发生、发展和调控,在烧伤早期和脓毒症时其血清含量显著升高($P < 0.01$),初步实验显示IL-6具有反馈诱导LBP合成与分泌的功能。该类细胞因子主要以自分泌或旁分泌方式发挥生物学效应,并且常常具有双重效应功能。因而研究肝组织IL-6、IL-6 mRNA的原位表达、与LBP的相关性表达并结合病理形态变化分析,对阐明烧伤复合内毒素血症肝损害的发病机理有重要意义。

在IL-6血清检测中发现,致伤后其含量分别在0.5、6~12 h出现两个峰值,认为第一峰值处于急性反应期,而第二峰值可能与双重致伤因素有关,这一结果与文献报道基本相符。另外,IL-6的血清动态变化与肝脏病理变化及肝脏酶谱分析呈明显正相关。免疫组化与原位杂交结果发现IL-6、IL-6 mRNA主要定位于SECs、KCs、PMNs、MPs,阳性表达集中在6~24 h,且IL-6 mRNA与LBP mRNA的表达(未报道)呈现一定的相关性。提示IL-6在烧伤复合内毒素血症肝脏损害的致病过程中起着重要作用,一方面局部组织产生的IL-6等活性物质由于过度表达直接作用于实质细胞而造成肝脏损害,另方面由于IL-6与TNF、LPS、地塞米松等协同作用[6],诱导LBP的合成与分泌,LBP起着催化放大LPS的毒性作用,同时过度刺激KCs、PMNs等细胞,反馈性促使IL-1、IL-6、TNF、血小板激活因子(PAF)、一氧化氮(NO)等活性介质大量产生,从而加重肝脏的损害。

IL-6基因结构分析显示[7,8],IL-6通过cis元件诱导LBP的基因转录,LBP基因5′侧翼克隆出典型的急性期蛋白启动子(命名为APRE/STAT-3)。实验中我们在细胞和分子原位水平也初步观察了IL-6、IL-6 mRNA的定位与分布,并与报道的LBP mRNA的表达趋势密切相关。新近研究显示[9],IL-6可以延迟PMN凋亡,导致大量存活的PMN聚集,通过细胞间粘附分子(ICAM)、E-选择素与SEC粘附增强,释放大量炎症因子、超氧化物、溶酶体酶等代谢产物,增强了细胞的毒性反应,也延迟了PMN介导炎症的消退,从而加重了组织细胞的损害。

在免疫组化与原位杂交对应实验中,发现原位检测IL-6蛋白和核酸表达时,往往出现阳性检出差异较大,即IL-6蛋白水平阳性检出效果较差,而核酸水平(mRNA)阳性检出效果较好,这可能由于IL-6表达蛋白属多肽类,其生物活性较不稳定,且组织标本采用石蜡切片,而IL-6转录产物mRNA在充分抑制RNase的前提下则不易受温度等其它因素的影响,但此现象的确切解释有待深入研究。

总之,对IL-6蛋白和核酸原位表达及意义的研究将进一步认识烧伤复合内毒素血症肝脏早期损害的本质,弄清与LBP及细胞因子网络的相互关系,但是对IL-6的表达规律和诱导分泌的始动因素以及启动LBP分泌的确切机理还有待深入研究。

(本校基础医学部生物化学教研室甘立霞博士协助探针标记,西南医院检验科黄兴玉副主任技师协助血清IL-6测定,一并谨致谢忱!)

参考文献

1 汪道新.IL-6及其在烧伤中的意义.国外医学:创伤与外科基本问题分册,1996,17(1):18

2 Liu Y S, Yan L S. Study of cytochemical changes of the liver and computer image analysis after thermal injury complicated with endotoxemia in rats. J Med Coll PLA, 1996, 11(2): 88

3 蔡文琴,王伯一.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社,1994.121~124

4 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T.分子克隆实验指南.第2版.北京:科学出版社,1992.495~933

5 Geller D A, Kispert P H, Su G L *et al*. Induction of hepatocyte lipopolysaccharide binding protein in model of sepsis and the acute-phase response. Arch Surg, 1993, 128(1): 22

6 Can Y H, Freeswick P D, Khemlani L S *et al*. Role of lipopolysaccharide (LPS), IL-1, IL-6, TNF, and dexamethasone in regulation of LPS-binding protein expression in normal hepatocytes and hepatocytes from LPS-treated rats. Infect and Immun, 1995, 63(7): 2435

7 王晓东,刘友生.脂多糖结合蛋白及其研究现状.国外医学:创伤与外科基本问题分册,1996,17(3):132

8 Schumann R R, Lamping N, Kirschning C *et al*. Lipopolysaccharide binding protein: Its role and therapeutical protential in inflammation and sepsis. Biochem Soc Trans, 1994, 22(1): 80

9 Biffl W L, Moore E E, Moore F A *et al*. Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor. J Trauma, 1996, 40(4): 575

(收稿:1997-03-19;修回:1997-04-21)

(编辑　冷怀明)

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

Expression of interleukin-6 mRNA and its protein in the liver at the early stage after burns complicated with endotoxemia in rats

Wang Xiaodong, Liu Yousheng, Feng Junming (Department of Pathology, Third Military medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To observe the distribution and cell localization of interleukin-6 (IL-6) mRNA in the liver after burns complicated with endotoxemia. Methods: After 156 Wistar rats were randomized into complex, burn, endotoxin-intoxicated and normal control groups, the changes of the content serum IL-6 and the expression and localization of liver IL-6 and IL-6 mRNA were investigated with serum quantification, immunohistochemistry and *in situ* hybridization. Results: Serum IL-6 reached its peak for twice at the 0.5th and 6th (12th h respectively. IL-6 mainly localized in sinusoid endothelial cells and Kupffer cells (KCs) while IL-6 mRNA in KCs, polymorphonuclear neutrophils and macrophages. Conclusion: IL-6 is one of the key cytokines in liver damage after burns complicated with endotoxemia in rats and closely correlated to the synthesis of lipopolysaccharide binding protein in hepatocytes.

Key words burns; endotoxemia; interleukin-6; lipopolysaccharide binding protein; immunohistochemistry; *in situ* hybridization; rat

博士生论文摘要

组织金属蛋白酶抑制剂 TIMP-2基因转染对胃癌细胞 SGC-7901侵袭能力的影响

The effect on invasiveness of gastric carcinoma cell SGC-7901 by transfection of tissue inhibitor metalloproteinase-2 gene

李 楠* 徐采朴 刘为纹 (第三军医大学附属西南医院消化内科) 重庆, 630038

实验以调查胃癌中 MMPs/TIMPs基因表达变化规律结果为依据,在体内构建了含人全长 TIMP-2 cDNA基因的可能控逆转录病毒表达载体,经转染到具有高侵袭能力的人胃癌细胞 SGC-7901B,检测到 TIMP-2基因整合人细胞基因组 DNA中,在 mRNA和蛋白水平表达有明显增高。表明所构载体正确并具有 TIMP-2蛋白活性,进一步分别从体内、外观察了 TIMP-2基因转染对胃癌细胞系的恶性侵袭表型的影响。

结果表明:① MMP-2 MT-MMP在胃癌患者中呈普遍高表达,与胃癌病程成正比。其中 MMP-2/TIMP-2比率随胃癌病程进展而升高,是较其它 MMPs/TIMPs与胃癌转移更为密切的肿瘤分子标志。② 筛选人胃癌 SGC-7901母系细胞株,获得有不同增殖和侵袭能力的二个亚系,其中 SGC-7901B其软琼脂形成率、Boyden Chamber侵袭能力均明显高于母系,是研究胃癌侵袭的良好细胞模型。③ 利用基因工程技术合成 91bp的 TIMP-2信号肽序列,与 TIMP-2 cDNA连接获得全长 TIMP-2 cDNA,并将 MT-1启动子与 TIMP-2全长可调控逆转录病毒载体。④ 外源基因 TIMP-2成功地整合人受体细胞 SGC-7901B,并在 mRNA水平表达明显增高。蛋白测定表明Ⅳ型胶原酶受到抑制,说明基因转染成功。⑤ TIMP-2基因转染可抑制 LN对肿瘤细胞的粘附,辅展作用,且随着作用时间延长作用更加明显,细胞表面微绒毛稀疏,胞内嵴减少。

6. TIMP-2基因转染使瘤细胞在裸鼠内瘤时间延长,成瘤率、侵袭能力受到抑制。

以上说明 TIMP-2基因转染下调了胃癌细胞恶性侵袭表型,是一个负调控因子。

关键词 基因转染;胃肿瘤;基因治疗; TIMP

中图法分类号 R735.2

(收稿: 1997-06-15;修回: 1997-07-10)

(编辑 冷怀明)

* 李 楠,男,39岁,博士研究生

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