DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.01.010

小鼠脾淋巴细胞白细胞介素-3基因表达的调节*

叶治家 董燕麟 曹廷兵 罗成基** 程天民** (第三军医大学基础部生物化学教研室)重庆,630038

提 要 以刀豆球蛋白A(ConA)、佛波酯(PMA)、钙离子导入剂(A_{23187})单独或联合刺激小鼠淋巴细胞,以寻求诱导小鼠脾淋巴细胞白细胞介素-3(IL-3)基因表达的最适条件。结果表明:ConA可单独诱导IL-3基因的表达,PMA或A_{23187}不能单独诱导IL-3基因的表达,而必须联合使用才能起诱导作用,三种刺激剂联合使用的诱导效果约为单独使用ConA的3～4倍,PMA与A_{23187}联合刺激诱导IL-3基因表达的效果较两种刺激剂其它方式组合诱导效果要好。揭示IL-3基因的最适表达依赖于蛋白激酶C(PKC)的激活及细胞内$[Ca^{2+}]i$升高两条作用途径。

关键词 白细胞介素-3;基因表达;佛波酯;钙离子导入剂;刀豆球蛋白A

中图法分类号 R392.12

白细胞介素-3(interleukin3,IL-3),又称多系集落刺激因子(multi-colony stimulation factor,multi-CSF),它主要由激活的T淋巴细胞产生,能刺激骨髓早期多能造血干细胞及一些定向祖细胞的增殖、分化,是体内重要的造血调控因子。当其产生失调很可能与某些白血病的发生有关[1]。体内IL-3基因的表达受到严格限制,国外一些学者对IL-3基因表达调控进行了较深入地研究[2],其结论不完全一致。本人在这些研究的基础上,在离体条件下,研究不同的刺激条件下小鼠脾淋巴细胞IL-3基因的表达情况,以寻求诱导IL-3基因表达的最适条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性BALB/C小鼠,体重17～22 g。由本校动物实验中心提供。

1.1.2 主要试剂 刀豆球蛋白A(ConcanavalinA,ConA)佛波酯(phorbol 12-myrisitate 13-acete,PMA),异硫氰酸胍、Tris、多核苷酸激酶均购自Sigma公司,钙离子导入剂(Calciumionophore,A_{23187})购自Boehringer公司;[$^{32}\gamma$-P]-ATP购自北京福瑞生物工程公司,重组鼠白细胞介素-3(rmIL-3)由美国Genetics institue,Inc惠赠;^{3}H-TdR购自中国原子能研究所;其它试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脾淋巴细胞的制备及培养 将小鼠仰卧固定后取整个脾脏,按杨景山的方法分离淋巴细胞[3]。按本室常规方法培养:每培养瓶内加入含10%小牛血清RPMI-1640培养液4 ml,青、链霉素各100 U/ml,细胞密度为2×10^6 cells/ml,按下列方案分组:a组:对照组(不加刺激剂);b组:加入PMA;c组:加入A_{23187};d组:加入ConA;e组:加入ConA及A_{23187};f组:加入ConA及PMA;g组:加入ConA及A_{23187};h组:加入ConA、PMA及A_{23187}。然后将细胞置于37℃培养。各刺激剂的浓度分别为:ConA 4 μg/ml;PMA 15 ng/ml;A_{23187} 0.25 μg/ml。

1.2.2 淋巴细胞总RNA的抽提 参见董增军的方法进行[4]。

1.2.3 IL-3 mRNA斑点杂交分析 以Fung等人[5]报道的鼠IL-3 cDNA中另一外显子内24个核苷酸序列:5'-AATCTCCTTGACAATAGAGCTGCA-3'作为杂交探针,采用固相亚磷酸三酯法,用本室ABI公司生产的381A型DNA合成仪合成,OPC柱纯化。Nothern blotting参见《分子克隆》中的方法进行。杂交斑点的显色强度用图像分析系统测定。

1.2.4 培养细胞上清中IL-3生物活性的检测 淋巴细胞经不同刺激条件活化,37℃培养到48 h,离心收集培养细胞上清,-70℃保存,以备检测。以支持IL-3依赖的32D细胞株的生长能力来定量测定IL-3的生物活性,即系列稀释标准rmIL-3及待测样品于96孔平底培养板中,100 μl/孔,每个稀释度有3～4个平行样孔,然后加32D细胞1×10^4/孔,于37℃ 5%CO_2条件下培养24 h后,掺入^{3}H-TdR 0.5 μg/孔,继续培养12 h,收获细胞至玻璃纤维纸上,干燥后用液闪仪测^{3}H-TdR掺入量。再根据标准曲线定量计算样品中IL-3的生物活性。

2 实验结果

2.1 不同刺激条件下小鼠脾淋巴细胞中IL-3 mRNA表达的变化

未加刺激剂或仅用PMA或A_{23187}单独刺激的脾淋巴细胞内,未检测到IL-3 mRNA的存在。ConA可单独诱导IL-3 mRNA的表达,两种或三种刺激剂联合作用诱导IL-3 mRNA表

* 全军"八五"攻关项目

** 预防医学系防原医学教研室 重庆,630038

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

达的量是ConA单独作用的表达量的3～4倍。在联合刺激中，以三种刺激同时作用刺激6 h后IL-3 mRNA的量最大，其次是PMA与A_{23187}联合刺激6 h后IL-3 mRNA表达的量，这两组之间差异没有显著性（$P>0.1$）。

以作用时间看，每种刺激条件下，以作用6 h左右IL-3 mRNA的量最多。其后，随着时间的延长，IL-3 mRNA的量逐渐减小。不同的刺激条件下，递减的速度不一样。ConA单独刺激24 h IL-3 mRNA的量不到最大量的1/5；而联合刺激24 h IL-3 mRNA的量均大于最大量的1/4，其中PMA加A_{23187}及三种刺激剂同时使用这两组24 h IL-3 mRNA的量均大于最大量的1/3。结果列于表1，表中数值将测得的样品中IL-3 mRNA的最大值(h组，6 h)标准化为100，其余样品的数据为与之比较而得到的相对值。

表1 不同刺激条件下作用不同时间淋巴细胞IL-3 mRNA杂交斑点的显色强度

Tab 1 Gray intensity levels of the dots of IL-3mRNA in lymphocytes stimuted by different conditions at various time

Group	Time (h)				
	3	6	9	12	24
a	0	0	0	0	0
b	0	0	0	0	0
c	0	0	0	0	0
d	29	27	18	12	6
e	87	96	84	71	36
f	78	70	61	41	27
g	71	82	67	47	21
h	93	100	83	68	39

2.2 不同刺激条件下培养上清中IL-3生物活性的变化

不同刺激条件下培养48 h所得培养上清中IL-3生物活性的变化与IL-3 mRNA量的变化趋势是一致的。IL-3的活性以h组最高，e组次之，两组之间差异没有显著性（$P>0.1$），联合刺激条件下产生的IL-3的活性比单独用ConA刺激产生IL-3的活性更强。PMA或A_{23187}单独刺激组上清中未检测到IL-3活性的存在。结果见表2。

表2 不同刺激条件培养的淋巴细胞上清中IL-3的活性(U/ml)

Tab 2 IL-3 production by cultured lymphocytes under different stimulations (U/ml)

Group	IL-3	Groups	IL-3
a	0.93±0.32	e	38.74±6.19
b	1.89±0.97	f	33.65±5.39
c	1.52±0.43	g	29.71±5.43
d	12.81±4.11	h	43.82±7.34

3 讨论

IL-3基因表达在体内受到严格限制，本文用dot blotting的方法未检测到新分离的小鼠脾淋巴细胞中有IL-3 mRNA的表达。至于IL-3基因表达调控的机理还没有完全搞清楚。最近的研究表明[6]，调节IL-3表达的顺式作用元件主要集中在IL-3基因5'侧翼转录起始位置上游380Nt内，其中有两个重要的增强子：AP-1结合位点(－301)及NF-IL3A(－156)，它们在增强IL-3基因表达中起重要作用，如缺失或定点突变，IL-3基因几乎失去可诱导的能力。

PMA是蛋白激酶C(PKC)的天然激活剂，PKC本身就是PMA的受体。PMA能增强IL-3基因的表达，说明IL-3基因的表达与PKC的激活有关。在癌基因c-fos、c-JUN启动区的DNA序列上存在PMA反应片段(PMA response element，PRE)，PMA可激活PKC而诱导这些癌基因的表达，c-fos、c-JUN等癌基因的产物AP家族蛋白形成转录因子复合物与位于IL-3基因5'侧翼AP-1结合位点(－301)结合而增强IL-3基因的表达，AP家族蛋白还可以同NF-IL3A呈低亲合力结合而诱导IL-3基因的表达。有实验证明，PMA诱导IL-3基因的表达并不能被蛋白质合成抑制剂放线菌酮(cycloheximide)完全阻断[7]，PMA诱导IL-3的表达并不完全依赖于重新合成转录调控因子，还可以使细胞内现存的转录调控因子激活而诱导IL-3的表达。本文结果表明，PMA单独不能诱导IL-3的表达，这说明IL-3基因的激活还需要另外的作用途径。

钙离子导入剂A_{23187}能使细胞内$[Ca^{2+}]$明显升高。同PMA相似，A_{23187}单独不能诱导IL-3基因的表达，但能明显增强受ConA或PMA刺激的淋巴细胞中IL-3的表达。ConA作用广泛，既能激活PKC又能刺激细胞内$[Ca^{2+}]$升高。因此，诱导IL-3基因的表达需要PKC激活及细胞内$[Ca^{2+}]$明显升高两条途径。

本文结果表明，联合刺激条件下生成的IL-3 mRNA比单独刺激生成的IL-3 mRNA更稳定。在IL-3 mRNA 3'端非翻译区存在UAAAU重复序列，这些序列与IL-3 mRNA的稳定性有关。PMA或A_{23187}可能通过激活PKC和钙调蛋白(CaM)而对细胞识别

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

UAAAU 重复序列的蛋白质进行修饰，被修饰的蛋白因子再特异与这些序列结合，从而增强 IL-3 mRNA 的稳定性。各种刺激条件对 IL-3蛋白合成的影响与对 IL-3 mRNA 蓄积量的影响基本是一致的，这说明 IL-3基因的表达调控主要发生在转录及转录后水平。

从理论上讲，PMA 与 A_{23187}既能增强 IL-3 mRNA 的表达，又能增强 IL-3 mRNA 的稳定性，从而增加 IL-3 mRNA 蓄积量，因此在受 PMA 或 A_{23187}刺激的淋巴细胞内理应存在一定量的 IL-3 mRNA。目前的阴性结果可能与实验方法的灵敏度有关，提高检测方法的灵敏度(如果用多种 PCR)可能得到阳性结果，这些问题有待进一步研究。

参考文献

1 叶治家，董燕麟. 白细胞介素-3的分子生物学研究进展. 国外医学：医学临床生物化学与检验学分册，1995；16：106

2 Ryan GR, Donahue RE, Wong MC *et al*. Human interleukin-3 mRNA accumumlation in controlled at both the transcriptional and posttranscriptional level. Blood, 1991; 77:1195

3 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京：北京医科大学出版社，1990：2～3

4 董增军. 快速法提取人淋巴细胞总 RNA. 中国免疫学杂志，1991；17：56

5 Fung MC, Hapel AJ, Ymer S *et al*. Molecular cloning of cDNA for murine interleukin-3. Nature, 1984; 307: 233

6 Dokter WHA, Esselink MT, Sierdsema SJ *et al*. Transcriptional and post-transcriptional regulation of IL-3 and IL-4 genes in human T cells. Blood, 1993; 81: 45

7 Van Straaten JFM, Dokter WHA, Stulp BK *et al*. The regulation of IL-5 and IL-3 genes expression in human T cells. Cytokine, 1994; 6: 229

(收稿：1995-08-10；修回：1996-01-10)

(编辑　沈锡庚、王　红)

Regulation of interleukin-3 gene expression of splenic lymphocytes in mice

Ye Zhijia, Dong Yanling, Cao Tinbing, Luo Chenji, Cheng Tianmin (Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract In order to determine the optimal condition of inducing interleukin-3 (IL-3) gene expression, concanavalin A (ConA), phorbol 12-myrisitate 13-acetate (PMA), calcium ionophore (A_{23187}) were used alone or in combination to stimulate the normal mouse splenic lymphocytes. It was found that stimulation with ConA alone or together with A_{23187} or PMA could induce IL-3 gene expression while A_{23187} or PMA alone failed to induce IL-3 gene expression. Stimulation of ConA together with A_{23187} or PMA and A_{23187} together with PMA resulted in approximately twofold to threefold greater IL-3 mRNA expression and IL-3 protein production than stimulation with ConA alone. These indicate that the optimal IL-3 gene expression is induced through two ways of protein kinase C (PKC) activation and mobilization of intracellular $[Ca^{2+}]i$.

Key words interleukin-3; gene expression; phorbol 12-myrisitate 13-acetate (PMA); calcium ionophore (A_{23187}); concanavalin A (ConA); mouse

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