DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.02.005

烧伤后白介素2与白介素2受体基因表达的变化及人参茎叶皂甙的调节作用*

梁华平 王正国 田丰群 耿 波 陈荣德 (第三军医大学野战外科研究所) 630042

提 要 研究了不同程度烧伤小鼠淋巴细胞白介素2(Interleukin 2,IL-2) mRNA及IL-2受体α(IL-2Rα) mRNA的变化,并观察人参茎叶皂甙的体内外调节作用。结果显示,烧伤后IL-2 mRNA及IL-2Rα mRNA水平均降低,且同伤情变化关系密切。伤后IL-2及IL-2Rα的变化分别同IL-2 mRNA、IL-2Rα mRNA的变化呈非常显著的正相关。人参茎叶皂甙皮下注射(50 mg·kg^{-1}·d^{-1},连续4 d)可显著提高烧伤小鼠淋巴细胞IL-2 mRNA及IL-2Rα mRNA水平,并促进IL-2生成及IL-2Rα表达。人参茎叶皂甙体外(0.1至100 μg/ml)也可拮抗烧伤小鼠IL-2 mRNA及IL-2Rα mRNA的受抑状态。上述结果表明,烧伤可致淋巴细胞IL-2及IL-2Rα的基因表达受抑,进而导致IL-2的生成及IL-2Rα的表达减少。人参茎叶皂甙对这一变化具有明显的拮抗效应。

关键词 灼伤;白介素2;受体,白介素2;RNA信使;人参皂甙

中图法分类号 R392.12

严重烧伤可致淋巴细胞白介素2(Interleukin 2,IL-2)的生成及IL-2受体(IL-2R)的表达减少,进而导致机体的多种细胞免疫功能受抑[1,2]。但其发生机理尚不清楚,因而也无有效的防治措施。鉴于烧伤后IL-2及IL-2R基因表达的变化尚未见报道,本研究利用核酸分子杂交的方法,对烧伤后IL-2 mRNA及IL-2Rα mRNA进行了动态检测,并观察人参茎叶皂甙的体内、外调节作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

Balb/c小鼠,雌雄各半,体重18~22 g。152只小鼠随机分为以下4组:正常对照组8只,从笼中取出立即活杀取脾,制脾细胞悬液待测;伤Ⅰ组、伤Ⅱ组、伤Ⅲ组分别为Ⅰ°、Ⅱ°、Ⅲ°烧伤模型。烧伤各组小鼠再随机分为6个亚组,分别分配于伤后1、2、4、7、10、14 d,每一亚组8只动物于相应时间活杀取脾,制脾细胞悬液待测。

1.2 烧伤模型

参照文献[3]制备小鼠背部10%体表面积的Ⅰ°、Ⅱ°、Ⅲ°烧伤模型(组织切片证实)。

1.3 淋巴细胞的培养与活化

将脾细胞以RPMI 1640培养液调成5×10^6/ml的细胞悬液,加入ConA(Sigma公司)使其终浓度为10 μg/ml,将细胞分别加入培养瓶(每瓶4 ml)和24孔培养板(每孔1 ml),置于37℃、5%CO_2培养箱中培养至10 h收集培养瓶中细胞,以异硫氰酸胍-苯酚-氯仿/异戊醇法提取细胞总RNA[4],-70℃保存待测IL-2 mRNA及IL-2Rα mRNA活性;培养至24 h收集培养板中细胞上清待测IL-2活性,培养至48 h收集培养板中细胞,测定IL-2Rα阳性细胞百分率。

1.4 IL-2 mRNA及IL-2Rα mRNA的测定

1.4.1 IL-2 cDNA、IL-2Rα cDNA探针的制备:从美国ATCC公司获得含重组质粒的大肠杆菌(37553、57232),参照文献[4]提取和纯化重组质粒DNA,分别以BamH Ⅰ及EcoR Ⅰ酶切,获取小鼠IL-2 cDNA 1.0 kb片段及IL-2Rα mRNA 0.92 kb片段。

1.4.2 探针的生物素标记、斑点杂交、显色及扫描测定:均参照文献[5]进行,结果以正常对照显色强度的百分比(%)表示。

1.5 IL-2活性及IL-2Rα阳性细胞的测定

以$CTLL_2$细胞株测定IL-2活性[3],结果以U/10^{6}细胞表示;以间接免疫荧光法[6]检测IL-2Rα阳性细胞百分率(%)。

1.6 人参茎叶皂甙的调节作用

1.6.1 体内实验:分为正常对照、正常给药、烧伤(Ⅱ°)对照、烧伤给药共4组,每组8只,给药组为每日皮下注射人参茎叶皂甙0.5 ml(由白求恩医科大学化学教研室提供,以生理盐水配成2 mg/ml,滤过除菌),相当于每日给药剂量为50 mg·kg^{-1},连续4 d。烧伤给药组为致伤当日开始给药,各对照组以相同剂量的生理盐水代替,第4天活杀动物,制备脾细胞悬液测定上述各指标。

1.6.2 体外实验:分组同上,于各组脾细胞培养开始时,加入

* 国家自然科学基金资助项目,No.39170744,39270860

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

人参茎叶皂甙，使其终浓度分别为0.01，0.1，1，10，100 μg/ml，测定上述各指标的变化。

1.7 数据处理

以平均值±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，进行成组或配对 t 检验，并进行相关分析。

2 结果

2.1 烧伤后小鼠淋巴细胞 IL－2 mRNA 及 IL－2的动态变化

和正常对照小鼠相比，烧伤各组小鼠淋巴细胞 IL－2 mRNA 均有不同程度的降低，且以伤后4 d 降为最低点，其降低的程度和持续时间随伤情加重而更为明显（见图1）；烧伤各组 IL－2活性也降低，其受抑的程度及持续时间均与 IL－2 mRNA 的变化相一致，二者呈非常显著的正相关（$r=0.79$，$P<0.01$）（见图2）。

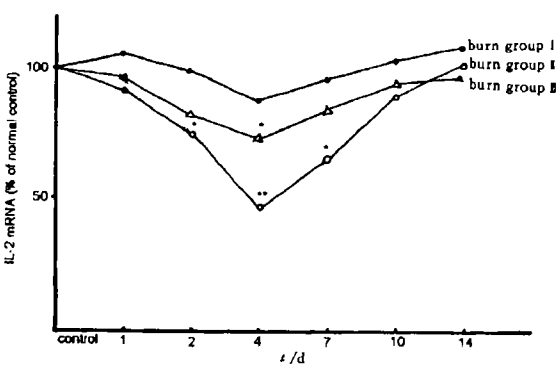


图1 烧伤小鼠淋巴细胞 IL－2 mRNA 的变化

Fig 1 Chang of IL－2 mRNA of lymphocytes from burned mice

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control group

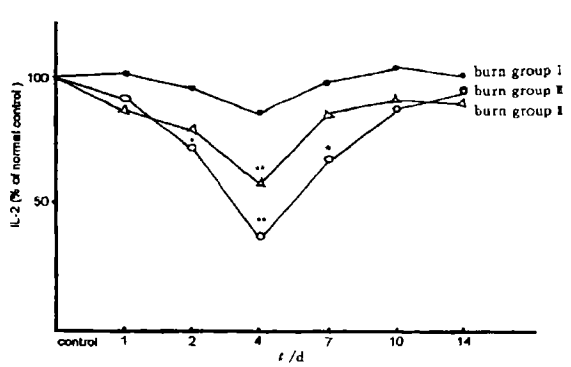


图2 烧伤小鼠淋巴细胞上清液中 IL－2的变化

Fig 2 Change of IL－2 in supernatant of lymphocytes from burned mice

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control group

2.2 烧伤后小鼠淋巴细胞 IL－2Rα mRNA 及 IL－2Rα 的动态变化

烧伤后小鼠淋巴细胞 IL－2Rα mRNA 的变化与 IL－2 mRNA 的变化相似，但其受抑程度和持续时间较 IL－2 mRNA 的变化更甚（见图3），伤后 IL－2Rα 的改变与 IL－2 Rα mRNA的变化相一致，二者呈非常显著的正相关（$r=0.61$，$P<0.01$）（见图4）。

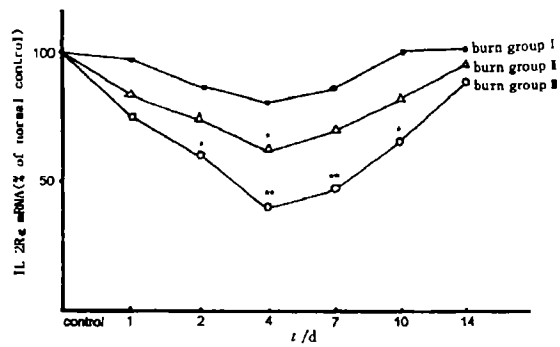


图3 烧伤小鼠淋巴细胞 IL－2Rα mRNA 的变化

Fig 3 Change of IL－2Rα mRNA of lymphocytes from burned mice

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control group

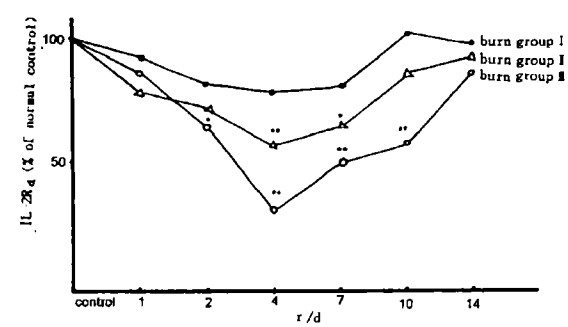


图4 烧伤小鼠淋巴细胞 IL－2Rα 的变化

Fig 4 Change of IL－2Rα of lymphocytes from burned mice

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control group

2.3 人参茎叶皂甙的体内调节作用

人参茎叶皂甙体内应用对正常小鼠淋巴细胞 IL－2 mRNA、IL－2活性以及 IL－2Rα mRNA、IL－2Rα 水平有一定升高作用，但无统计学意义；可明显提高烧伤小鼠淋巴细胞 IL－2 mRNA、IL－2活性以及 IL－2Rα mRNA、IL－2Rα 水平，并使之同正常对照无明显差异（见附表）。

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

附表　人参茎叶皂甙的体内调节作用($n=8$)

Table　Regulation of GSL *in vivo* ($n=8$)

Group	IL－2 mRNA (%)	IL－2 (U/10^6 cells)	IL－2Rα mRNA (%)	IL－2Rα (%)
Control	100±11	52±8.0	100±13	64±13
GSL	121±14	56±9.6	119±8.0	6.7±14
Burn	48±5.7**	17±8.6**	43±6.0**	33±14**
Burn+GSL	112±9.0△△	51±7.4△△	108±9.5△△	66±12△△

**：$P<0.01$，*vs* control group；△△：$P<0.01$，*vs* burn group

2.4　人参茎叶皂甙的体外调节作用

人参茎叶皂甙在0.01～100 μg/ml 浓度范围内，对正常小鼠淋巴细胞 IL－2 mRNA 无明显升高作用，但可使烧伤小鼠淋巴细胞 IL－2mRNA 水平升高，使之接近或超过正常对照水平，这一作用在10 μg/ml 浓度时最为明显(见图5)，其对 IL－2、IL－2Rα mRNA 以及 IL－2Rα 水平的体外调节作用与此相类似(图略)。

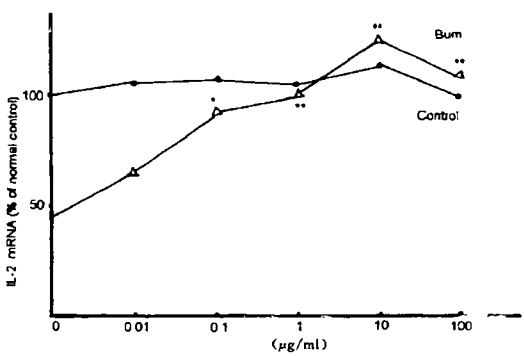


图5　人参茎叶皂甙对淋巴细胞 IL－2mRNA 的体外调节作用

Fig 5　Regulation of GSL to IL－2 mRNA of lymphocytes *in vitro*

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* burn group (untreated with GSL)

3　讨论

有关烧伤后淋巴细胞 IL－2与 IL－2R 受抑的报道较多[1,2,7]，但其发生机理尚不清楚。本研究对烧伤后淋巴细胞 IL－2mRNA 及 IL－2RαmRNA 的变化进行了动态检测，发现烧伤后 IL－2mRNA 及 IL－2RαmRNA 水平均降低，且同伤情变化关系密切。表明烧伤确可导致淋巴细胞 IL－2及 IL－2Rα 的基因表达受抑。此外还观察到烧伤后 IL－2活性及细胞膜 IL－2Rα 表达的变化分别同 IL－2mRNA 及 IL－2RαmRNA 变化关系密切。提示烧伤后淋巴细胞 IL－2及 IL－2Rα 的基因转录减少是导致 IL－2生成减少及 IL－2Rα 表达受抑的重要原因。

纠正烧伤后的细胞免疫功能低下是防治烧伤感染的关键[8]。国外学者[7,8]应用多种细胞因子纠正烧伤免疫功能低下已取得一定疗效，但由于其价格昂贵，作用单一，有一定毒副作用，故难以在临床推广应用。中药有效成分——人参茎叶皂甙的免疫调节作用已有报道[9]，但其是否可纠正烧伤后的细胞免疫功能低下，尚不清楚。本研究发现人参茎叶皂甙体内应用(50 mg·kg^{-1})虽对正常小鼠淋巴细胞 IL－2mRNA、IL－2RαmRNA、IL－2及 IL－2Rα 水平无明显升高作用，但可明显提高烧伤小鼠淋巴细胞 IL－2及 IL－2Rα 的基因表达，从而拮抗 IL－2及 IL－2Rα 的受抑状态。这一发现为从基因转录水平阐明人参茎叶皂甙对烧伤后细胞免疫功能的调节作用提供了重要依据。我们还观察到人参茎叶皂甙在0.1～100 μg/ml 浓度范围内，可直接作用于烧伤小鼠淋巴细胞，提高其 IL－2及 IL－2Rα 的基因转录水平。提示人参茎叶皂甙在体内外对烧伤后免疫功能低下可能具有“正常化”的作用。我们在另一实验中曾观察到，人参茎叶皂甙可通过提高烧伤小鼠的多项免疫功能指标，进而降低烧伤小鼠对感染的易感性(另文报道)。有关烧伤后 IL－2及 IL－2Rα 基因表达受抑及人参茎叶皂甙的作用机理，尚需深入研究。

参考文献

1　梁华平，赵鄞生.创伤后白介素2产生受抑的机制及其研究进

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

展.国外医学:军事医学分册,1991;4:145
2 梁华平,李建南,赵鄞生.烧伤与淋巴细胞IL-2R表达.中国实验临床免疫学杂志,1992;4:48
3 梁华平,赵鄞生.烧伤后血清对T淋巴细胞抑制的实验研究.解放军医学杂志,1991;16:446
4 Anastassiou ED, Paliogianni F, Balow JP et al. Prostaglandin E2 and other cyclic AMP-elevating agents modulate IL-2 and IL-2R gene expression at multiple levels. J Immunol,1992;148(9):2845
5 李银太,林万明,王 津等.国产生物素标记DNA探针及其应用的研究.中华流行病学杂志,1990;11(特刊6号):1
6 Diamantstein T, Osawa H, Mouzaki A et al. Regulation of interleukin 2 receptor expression and receptor release. Molec Immunol,1986;23(11):1165
7 Teodorczky-Injeyan JA, Sparkes BG, Mills GB et al. Impaired expression of interleukin 2 receptor in the immunosuppressed burned patient: Reversal by exogenous IL-2. J Trauma,1987;27:180
8 Horgan PG, Mannick JA, Dubravec DB et al. Effect of low dose recombinant interleukin 2 plus indomethacin on mortality after sepsis in a murine burn model. Br J Surg,1990;77:401
9 马 肃,王北辰,吕俊华等.人参茎叶皂甙对小鼠免疫功能的影响.中国病理生理杂志,1991;7:126

(收稿:1994-10-18;修回:1995-03-16)

Study of the gene expression changes of interleukin 2 and its receptor after burn injury and the modulation effects of ginsenoside in mice*

Liang Huaping, Wang Zhengguo, Tian Fengqun, Gan Bo, Chen Rongde (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The changes of interleukin 2 (IL-2) mRNA and its receptor α(IL-2Rα) mRNA of lymphocytes were studied in mice with different degrees of burn injury and the modulation effects of ginsenoside from the ginsen stem and leaves were observed *in vivo and invitro*. It was found that the levels of IL-2 mRNA and IL-2Rα mRNA were reduced after burn injury and the reduction was related to the severity of burn injury. There was a significant correlation between the levels of IL-2 and IL-2 mRNA and those of IL-2Rα and IL-2Rα mRNA postburn. Subcutaneous administration of ginsenoside of the dosage 50 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ for 4 consecutive days after burns could significantly increase the levels of IL-2 mRNA and IL-2Rα mRNA and enhance the production of IL-2 and the expression of IL-2Rα. Ginsenoside of the dosage 0.1~100 μg/ml could alleviate the suppression of IL-2 mRNA and IL-2Rα mRNA after burn injury in vitro. These findings suggest that burn injury can suppress the gene expression of IL-2 and IL-2Rα of lymphocytes and ginsenoside exerts excellent therapeutic effects on these changes.

Key words burns; interleukin-2; receptor, interleukin-2; RNA, messenger; ginsenoside

* This project was financially supportd by the National Funds for Natural Science of China, No. 39170744, 39270860

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