

烧伤患者血清对单核细胞核因子 κ B 核移位的影响

李志清 黄跃生 杨宗城 王甲汉

【摘要】 目的 观察烧伤患者血清(以下称烧伤血清)对单核细胞核因子 κ B(NF- κ B)异二聚体 p50、p65 核移位及核抑制因子 κ B α (I κ B α)降解的影响,进一步探讨烧伤血清对单核细胞活化的作用。

方法 收集体外培养的人外周血单核细胞(PBMC),分别用正常人血清、烧伤血清、烧伤血清+吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC)刺激 PBMC(依次分为对照组、烧伤血清组、PDTC组),应用激光共聚焦显微镜观察血清刺激 30、60、120、480 min 后 PBMC 的 p50、p65 核移位;采用 Western 印迹法检测刺激 30、60、90、120 min 时 PBMC 的 I κ B α 蛋白降解情况。**结果** 与对照组比较,刺激 30 min 后烧伤血清组 PBMC 中 p50、p65 即发生核移位,30~60 min 达高峰,120 min 后核内聚集减少,回复至刺激前状态。刺激 30 min 后烧伤血清组 PBMC I κ B α 发生降解,刺激 60 min 后含量几乎为零,与对照组比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$),120 min 后表达水平逐渐恢复。PDTC 组 PBMC I κ B α 降解[刺激 60 min 后含量为 $(11.57 \pm 1.98) \times 10^4$ 积分灰度值]及 p50、p65 核移位程度比烧伤血清组轻($P < 0.01$)。**结论** 烧伤血清可导致 PBMC I κ B α 降解和 p50、p65 核移位,进而活化 NF- κ B,诱导 PBMC 分泌细胞因子。PDTC 对此变化有抑制作用。

【关键词】 烧伤; 血清; 单核细胞; NF- κ B; 抑制因子,免疫

Effect of burn serum on the nuclear translocation of monocytic NF- κ B p50/p65 LI Zhi-qing*, HUANG Yue-sheng, YANG Zong-cheng, WANG Jia-han. *Department of Burns, Nanfang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, P. R. China

Corresponding author: HUANG Yue-sheng, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State key laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China. Email: yshuang@public.cta.cq.cn, Tel: 023-68754173

【Abstract】 Objective To investigate the effects of burn serum on nuclear translocation of monocytic NF- κ B heterodimers p50/p65 and the degradation of inhibiting κ B(I κ B α), so as to further explore the role of burn serum on the activation of monocytes. **Methods** Peripheral blood monocytes (PBMCs) isolated from healthy volunteers were employed as the target cells. The cells were stimulated by the serum from healthy volunteers and burn patients, and by burn serum together with pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). Sera from normal healthy volunteers were taken as control. The nuclear translocation of monocytic p50 and p65 at 30th, 60th, 120th and 480th post stimulation minutes (PSM) was observed with laser confocal microscopy. The degradation of monocytic I κ B α protein at 30th, 60th, 90th and 120th PSM was determined by Western blot.

Results Compared to that in control group, the nuclear translocation of monocytic p50 and p65 took place 30 min after the PBMCs were stimulated by burn serum, peaking at 30 to 60 min, but it gradually recovered to pre-stimulation state at 2 hrs with decreased intra-nuclear collection. Meanwhile, the I κ B α degradation occurred within 30 min after PBMCs being stimulated by burn serum, and it peaked at 60 mins. However, I κ B α gradually reappeared in the cytoplasm after 2 hrs of stimulation. PDTC (an antioxidants) could effectively inhibit monocytic I κ B α degradation and nuclear translocation of NF- κ B induced by burn serum. **Conclusion** Burn serum could induce nuclear translocation of p50 and p65 components of NF- κ B in monocytes into the nucleus and degradation of I κ B α , leading ultimately to the secretion of cytokines from the PBMCs.

【Key words】 Burns; Serum; Monocyte; NF- κ B; Suppressor factors, immunologic

单核-巨噬细胞是创伤、感染导致全身炎症反应

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(G1999054202); 国家杰出青年科学基金资助项目(30125040)

作者单位:510515 广州,第一军医大学南方医院烧伤科(李志清、王甲汉);第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(黄跃生、杨宗城)

通信(讯)作者:黄跃生,400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,Email:yshuang@public.cta.cq.cn,电话:023-68754173

发生的关键效应细胞,通过释放肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)8 等促炎细胞因子,进一步触发其他效应细胞失控性释放炎症细胞因子,导致全身炎症反应发生^[1]。核因子(nuclear factor κ B, NF- κ B)是调控单核-巨噬细胞活化、释放促炎细胞因子的关键,它的活化涉及核抑制因子 κ B α (I κ B α)磷酸化、降解、核移位等多个环节,其中 I κ B α 发生磷酸化和降解是 NF- κ B 活化的前提^[2]。本研究旨在了

解烧伤患者血清(以下称烧伤血清)刺激下单核细胞 NF-κB 的活化规律。

材料与 方法

1. 主要试剂与仪器: RPMI 1640 培养基(美国 Gibco-BRL 公司), 兔多克隆抗体 NF-κB p65 和 IκBα、羊多克隆抗体 NF-κB p50(美国 Santa Cruz 公司), 二氨基联苯胺(DAB)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗兔 IgG、FITC 标记兔抗羊 IgG、辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素(SPA-HRP)和羊抗兔 IgG(北京中山生物工程公司), 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC)、考马斯亮蓝 G-250(美国 Sigma 公司), 激光共聚焦显微镜系统(德国 Leica 公司), 硝酸纤维膜(美国 GIB 公司), 垂直电泳仪、电转仪、干胶仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2. 采集人外周血单核细胞(peripheral blood monocytes, PBMC): 取正常人肝素抗凝全血, 并用等量 Hank 缓冲液稀释。加入淋巴细胞分离液, 用离心半径 8 cm、2000 r/min 离心 15 min。吸出 PBMC 后再次离心, 漂洗 2 次。用 RPMI 1640 培养液将所得 PBMC 接种于培养瓶, 孵育 40~60 min。倾去含淋巴细胞的上清, 收集培养瓶上的黏附细胞即 PBMC。台盼蓝染色计数, 要求活细胞数 >96%。

3. 烧伤血清收集: 烧伤患者男 5 例、女 2 例, 年龄 15~50 岁, III 度烧伤面积 30%~80% TBSA, 均于伤后 1~2 d 抽取外周静脉血, 分离血清。另取 7 例健康志愿者外周血血清。血清灭活补体后 -20℃ 保存。使用前分别与 RPMI 1640 培养液按 1:5 体积比混合。

4. 实验分组: 将所得 PBMC 接种于 24 孔培养板, 每孔细胞数 5×10^5 个, 每样本设双孔取均值。实验分正常血清刺激组(对照组)、烧伤血清刺激组(烧伤血清组)、烧伤血清 + PDTC 干预组(PDTC 组)。PDTC 组即在刺激 PBMC 前 1 h 将 PDTC 加入烧伤血清中, 使其终浓度达 100 μmol/L。

5. 观察 PBMC 的 p50、p65 核移位: 各组血清刺激前与 PBMC 刺激 30、60、120、480 min 后, 用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗, 滴加稀释的 NF-κB p65、NF-κB p50 多克隆抗体, 4℃ 过夜。PBS 漂洗, 滴加 FITC 标记的二抗, 于 37℃ 暗盒中孵育 1 h。用体积分数 90% 的甘油封片, 激光共聚焦显微镜下观察、照相。

6. 胞浆内 IκBα 的含量: 将 5×10^5 PBMC 接种于 5 cm 培养皿中, 待细胞生长 48 h 呈融合状后, 按上述分组方法分别加入已制备的正常人血清、烧伤血清、烧伤血清 + PDTC, 刺激 30、60、90、120 min。加

入十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液裂解细胞, 离心取上清。胞浆蛋白经考马斯亮蓝蛋白定量后点样, 行质量浓度 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完毕, 电转、封闭。将膜与 1:2000 兔抗 IκBα 多克隆抗体在 4℃ 下共孵育过夜。溶液漂洗后, 加入 1:200 生物素标记的羊抗兔 IgG 后室温孵育 1 h。漂洗, 加入 1:200 SPA-HRP 室温孵育 1 h, 漂洗后置于 DAB 溶液中避光显色 10 min。将滤膜用光密度扫描仪输入电脑, 用电泳区带分析软件 Image Tool 分析蛋白区带, 并用积分灰度值表示。

7. 统计学处理: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并采用 Excel 统计分析软件进行 t 检验。

结 果

1. 烧伤血清对 PBMC p50、p65 核移位的影响: 正常未受刺激的 PBMC p50、p65 主要存在于胞浆内(图 1)。对照组未见 p50、p65 发生明显的核移位。烧伤血清刺激后 PBMC 迅速发生核移位, 30 min 达高峰, 胞核内 p50、p65 明显增多, 胞浆内 p50、p65 减少(图 2)。120 min 后基本恢复到基础状态。PDTC 组各时相点无明显核移位现象。

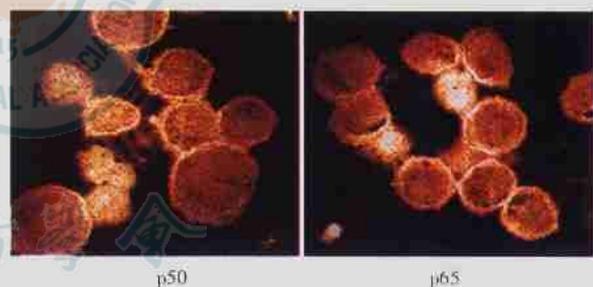


图 1 刺激前 PBMC p50、p65 主要表达在胞浆 激光共聚焦显微镜 ×400

Fig 1 Untreated monocytes have a substantial pool of both p50 and p65 in a cytoplasmic reserve laser confocal microscope ×400.

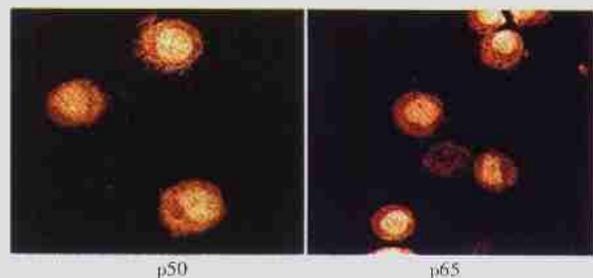


图 2 刺激后 30 min, 烧伤血清组 PBMC p50、p65 迅速向胞核移位 激光共聚焦显微镜 ×400

Fig 2 After incubation with burn sera for 30 min, both p50 and p65 of PBMC in burn serum group were markedly increased in the nucleus of monocytes laser confocal microscope ×400

2. 烧伤血清对 PBMC IκBα 降解的影响: 正常 PBMC IκBα 蛋白水平表达较高。对照组 IκBα 未发

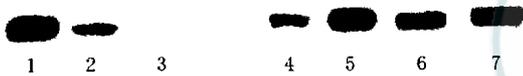
生明显降解,但烧伤血清刺激 PBMC 30 min 后 IκBα 即发生降解,刺激 60 min 后几乎检测不到其表达,120 min 后表达逐渐回升。PDTC 组与烧伤血清组比较,刺激 30、60、90 min 后 IκBα 的降解量明显降低,差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。见表 1、图 3。

表 1 烧伤血清对 PBMC IκBα 蛋白表达的影响
($\times 10^4$ 积分灰度值, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of burn sera and PDTC on the IκBα protein expression in PBMCs ($\times 10^4$ A, $\bar{x} \pm s$)

组别	刺激前	刺激时间 (min)			
		30	60	90	120
对照组	18.70 ± 3.24	16.30 ± 1.25	17.55 ± 3.12	19.37 ± 3.56	18.64 ± 3.83
烧伤血清组	18.70 ± 3.24	5.23 $\pm 0.86^*$	0.00 ± 0.00	8.16 $\pm 1.15^*$	16.85 ± 2.70
PDTC 组	18.70 ± 3.24	9.66 $\pm 1.55^{\Delta}$	11.57 $\pm 1.98^{\Delta}$	10.39 $\pm 1.61^{\Delta}$	-

注:每组每时相点 3 个培养皿;与对照组比较, * $P < 0.01$;与烧伤血清组比较, $\Delta P < 0.01$;“-”表示未检测



注:1~5 分别为烧伤血清组刺激前及刺激 30、60、90、120 min 时;6、7 各为 PDTC 组刺激 30、60 min 时

图 3 烧伤血清组与 PDTC 组单核细胞 IκBα 的表达

Fig 3 The expression of monocytic IκBα in burn serum and PDTC groups

讨 论

严重烧伤后早期激活的单核-巨噬细胞是机体产生 TNF-α 等促炎细胞因子的关键效应细胞,它参与烧伤后机体炎症反应和脏器损害。诱导单核-巨噬细胞分泌 TNF-α 的关键环节在于 TNF-α 基因转录水平,涉及 NF-κB、增强子结合蛋白、激活蛋白 1 等核转录因子的调控,其中最为重要的是 NF-κB^[3]。NF-κB 由多亚基构成同源或异源二聚体,其中以 p50、p65 异源体较为普遍。本实验应用激光共聚焦检测正常人 PBMC,结果其胞浆内见大量 p50 和 p65 表达,而核内极少。与既往研究结果^[4]一致。在烧伤血清刺激后,胞核内 p50、p65 表达增多,30 min 达高峰,胞浆内 p50、p65 表达明显减少,说明 p50、p65 在刺激 30 min 时发生了明显的核移位。

正常静息细胞中,NF-κB 与 IκB 结合成无活性的三聚体存在于胞浆,IκB 掩盖了 NF-κB 核移位序列,抑制 NF-κB 核移位。在许多刺激因素作用下,IκB 发生磷酸化或降解,与 NF-κB 解离,导致 NF-κB 移位至胞核,与其相应的基因启动子序列结合,启动

基因转录。因此,IκB 降解是 NF-κB 活化的前提。目前已知 IκB 家族包括 IκBα、IκBβ、IκBγ、IκBδ、IκBε 等,其中以 IκBα 的降解与 NF-κB 活化关系最为密切^[3]。笔者观察到静息状态下 PBMC 存有较多 IκBα,烧伤血清刺激后 IκBα 蛋白表达迅速减少,60 min 后几乎检测不到,IκBα 降解达高峰。而此时正邻近 p50、p65 核移位高峰,说明 IκBα 降解与 p50、p65 核移位密切相关。同时,PBMC 在烧伤血清刺激后 IκBα 降解,p50 和 p65 核移位是一迅速发生又迅速恢复至基础状态的过程。在细胞内,IκBα 基因启动子中含有 NF-κB 反应元件,NF-κB 活化后启动细胞因子基因转录的同时,也上调 IκBα 及 p105 (另一抑制性蛋白)基因的转录,使 IκBα 在胞浆内的表达重新增多,“再生”的 IκBα 与 NF-κB 结合,抑制其活化和核移位,从而降低 NF-κB 依赖基因的转录。由 NF-κB/IκBα 在烧伤血清刺激 PBMC 后的动态变化表明单核细胞活化时,NF-κB/IκBα 之间的相互作用存在自身调节机制,并且是一个紧密的调控过程,保证了 PBMC 及时恢复至可刺激状态,从而对另一新环境的刺激作出适当的应激反应。

本研究进一步证实烧伤血清可导致 PBMC 中 IκBα 降解,p50、p65 核移位,NF-κB 活化。烧伤血清内含有机体伤后所产生的多种细胞因子和毒性产物(如 TNF-α、内毒素等),可能是其诱导 IκBα 降解及 p50、p65 核移位的主要原因。同时烧伤血清令炎症细胞核因子活化,可能在烧伤后炎症细胞因子过度释放、脏器损害发生过程中起重要作用^[5]。

本实验中,经 PDTC (100 μmol/L) 预先处理的 PBMC,在烧伤血清刺激 30、60 min 时 IκBα 的降解和 NF-κB 核移位明显减弱,提示 PDTC 抑制了 NF-κB 的活化,其具体作用机制尚需作进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 潘曙明,陈德昌,杨兴易.核因子-κB 研究与脓毒症.中华急诊医学杂志,2002,11:62-63.
- 2 李志清,黄跃生,杨宗城.烧伤血清对内皮细胞核因子-κB 核移位的影响.中华烧伤杂志,2002,18:265-267.
- 3 李凝旭,李建军,李庚山,等.细菌脂多糖诱导人体外周血单核细胞肿瘤坏死因子 α 的合成及核因子-κB 的活化.中国动脉硬化杂志,2002,10:320-323.
- 4 Ammon C, Mondal K, Andresen R, et al. Differential expression of the transcription factor NF-κB during human mononuclear phagocyte differentiation to macrophages and dendritic cells. Biochem Biophys Res Communication, 2000,268:99-105.
- 5 Foulds S, Galustian C, Mansfield AO, et al. Transcription factor NF-κB expression and postsurgical organ dysfunction. Ann Surg, 2001, 233:70-78.

(收稿日期:2003-06-12)

(本文编辑:赵敏 王旭)