

毒鼠强中毒鼠肝细胞因子信号转导抑制因子-3 和肿瘤坏死因子- α 的表达

Expression of SOCS3 and TNF- α in liver of TEM poisoned mice

魏明, 梁颖红, 涂玲, 刘佳, 张俊华

WEIMING LIANG Ying-hong TU Ling LIU Jia ZHANG Jun-hua

(郑州大学第五附属医院, 河南 郑州 450052)

摘要: 为探讨细胞因子信号转导抑制因子-3 (SOCS3) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA表达在毒鼠强中毒 (TEMP) 致多器官功能衰竭 (MODS) 中的作用, 将 30 只健康雄性 BALB/c 小鼠随机分成 TEMP 模型组 ($n=10$)、生理盐水对照组 ($n=10$)、正常对照组 ($n=10$), 分别于中毒后 2、6、12、24 h 取小鼠的肝脏, 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定肝组织 SOCS3 和 TNF- α mRNA 表达水平。结果显示, 中毒后 2、6、12 和 24 h 肝组织中 SOCS3 mRNA 表达量均明显高于对照组 ($P < 0.05$), 24 h 达到峰值。TNF- α mRNA 表达量均明显高于对照组 ($P < 0.05$), 12 h 达峰值。相关分析显示, 肝脏中 SOCS3 mRNA 与 TNF- α mRNA 表达存在明显的正相关性 ($r = 0.091 + 0.747x$, $r = 0.912$, $F = 261.2$, $P < 0.01$)。提示不同时间点 TEM 中毒小鼠肝脏中 SOCS3、TNF- α mRNA 均升高且表达趋势一致。

关键词: 细胞因子信号转导抑制因子-3 肿瘤坏死因子- α ; 毒鼠强; 中毒; 多器官功能障碍综合征

中图分类号: R979.8 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2011)04-0286-03

毒鼠强中毒 (TEMP) 是急诊科常见的急危重症, 可造成多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 尤其是重症死亡病例大多与多器官功能障碍综合征密切相关。毒鼠强致 MODS 发病机制及治疗是当今医学界共同瞩目的研究热点。目前有关内毒素、细胞炎症因子、抗炎因子的研究较多, 近年随着分子生物学的进展, 人们发现信号传导与转录活化因子 (STAT) 及其负反馈抑制因子 (SOCS) 在炎症介质激活释放过程中起重要作用, SOCS 可能对调控炎症因子的基因表达起重要作用。但目前国内有关 SOCS 在毒鼠强致 MODS 的研究鲜见报道, 本实验通过对毒鼠强中毒小鼠肝脏中 SOCS3、TNF- α mRNA 的表达进行检测, 旨在探讨 SOCS3 和 TNF- α 在毒鼠强致 MODS 中的作用机制, 为其治疗提供帮助。

1 材料与与方法

1.1 实验分组

健康雄性 BALB/c 小鼠 30 只, 体重 25~30 g, 随机分成毒鼠强中毒组、生理盐水对照组、正常对照组, 每组 10 只。

收稿日期: 2010-11-02 修回日期: 2011-04-13

作者简介: 魏明 (1968-), 男, 副主任技师, 主要从事细胞因子在炎症发病机制中作用研究。

1.2 实验方法

中毒组按 35 mg/kg 剂量毒鼠强将小鼠灌胃染毒, 盐水对照组以等量生理盐水灌胃。正常对照组、盐水对照组及中毒组于染毒后 2 h、6 h、12 h、24 h 每组各取 2 只小鼠取肝脏, 生理盐水冲洗后剪碎, 迅速装入冷冻管中, 置于 -80°C 液氮中保存备用。毒鼠强从郑州市工商局稽查大队获得, 规格为 1.5 mg/g。

1.3 以逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定 SOCS3、TNF- α mRNA 表达水平

1.3.1 主要试剂、仪器 TRIZOL, RT 试剂盒, PCR 试剂盒由美国 MB 公司提供。引物由上海生工生物工程技术有限公司提供。主要仪器为美国 ABI 荧光定量 7300 PCR 仪。

1.3.2 引物设计与合成 小鼠 SOCS3、TNF- α 和内参照 β -actin 的引物序列查阅 GENE BANK 获得, 其序列分别为 SOCS3 (251 bp) 上游引物: 3'-ACA TTG GCC AGT CCT AGT CAT-5', 下游引物: 3'-GAG AAA AAA GCC ACC CCA-5'; β -actin (330 bp) 上游引物: 3'-AAG ATC ATT GCT CCT CCT GAG-5', 下游引物: 3'-GAG TCA AAA GCG CCA C-3'; TNF- α (422 bp) 上游引物: 3'-AGT CCG GCG AGG TCT ACT TT-5', 下游引物: 3'-GCA CCT CAG GGA AGA GTC TG-5'。

1.3.3 总 RNA 的提取 按 TRIZOL 法提取肝组织中总 RNA 操作严格按试剂盒说明进行。

1.3.4 cDNA 合成 采用 MB 公司的 Rever Aid IMM-MuLV First Strand Cdn Synthesis Kit 试剂盒, 以 Oligo(dT)18 为引物合成第一链 cDNA 反应。

1.3.5 PCR 反应体系 反应条件: 94°C 2 min 预变性, 94°C 30 s (变性), T_m 30 s (退火), 72°C 45 s (延伸), 72°C 7 min (延伸), 共 35 个循环 [注: $T_m(\beta\text{-actin}) = 60^{\circ}\text{C}$, $T_m(\text{SOCS3}) = 50^{\circ}\text{C}$, $T_m(\text{TNF-}\alpha) = 60^{\circ}\text{C}$]。

1.3.6 PCR 产物的检测 取 10 μl 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 完毕后置 5 μM 溴化乙锭染液染色 10 min, 采用凝胶成像和化学发光图像分析系统, 测定电泳条带 A 值, 以 β -actin 作内参物, 计算 SOCS3、TNF- α 条带与 β -actin A 值的比值, 比值即为扩增产物定量相对值。

1.4 统计学方法

计量资料以均数 \pm 标准差表示。统计处理采用 SPSS 17.0 统计软件, 各组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时间点肝脏中 SOCS3和 TNF-α mRNA表达分析

中毒后 2 h 6 h 12 h和 24 h其肝脏中 SOCS3 mRNA表达量均明显高于对照组 (P均<0.05), 24 h达到峰值; TNF-α mRNA表达量均明显高于对照组 (P均<0.05), 12 h达峰值。详见表 1。

表 1 不同时间点肝脏中 SOCS3和 TNF-α mRNA表达

组别	例数	SOCS3 mRNA	TNF-α mRNA
正常对照组	10	0.235 ± 0.011	0.248 ± 0.011
盐水对照组	10	0.254 ± 0.022	0.277 ± 0.021
毒鼠强中毒组			
中毒 2 h	10	0.597 ± 0.074	0.696 ± 0.078
中毒 6 h	10	0.736 ± 0.092	0.885 ± 0.083
中毒 12 h	10	0.874 ± 0.096	1.321 ± 0.098
中毒 24 h	10	1.147 ± 0.099	1.045 ± 0.097

2.2 肝脏中 SOCS3和 TNF-α mRNA电泳结果分析

中毒后 2 h 6 h 12 h 24 h肝脏中 SOCS3基因的 mRNA表达, 其中 24 h达到最高峰 (P<0.05 图 1)。肝中 TNF-α 基因的 mRNA表达于 12 h达最高峰, 之后到 24 h有所下降 (P<0.05 图 2)。

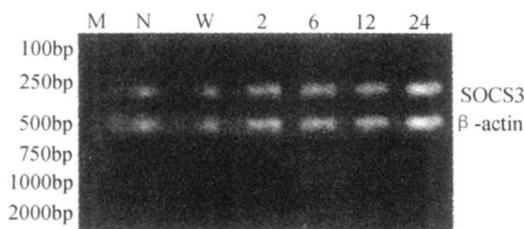


图 1 肝脏中 SOCS-3 的电泳结果

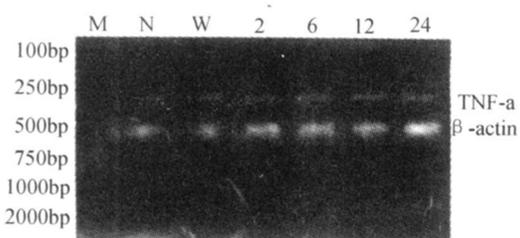


图 2 肝脏中 TNF-α 的电泳结果

2.3 肝脏中 SOCS3和 TNF-α mRNA相关性分析

经相关分析显示, 肝脏中 SOCS3和 TNF-α mRNA存在明显的正相关性 ($Y=0.091+0.747x$, $r=0.912$, $F=261.2$, $P<0.01$), 提示不同时间点, 中毒小鼠肝脏中 SOCS3, TNF-α mRNA表达趋势一致。

3 讨论

毒鼠强中毒后, 由于毒物的作用, 使人体处于一种非生理性的应激状态, 伴有缺氧、休克、缺血/再灌注损伤、合并感染等诱发因素, 促使炎症介质失控性释放, 从而引发 MODS。目前认为全身炎症反应综合征 (SIRS) 与代偿性抗炎反应综合征 (CARS) 之间平衡被打破甚至失控是 MODS形成的根本原因及重要的病理基础, 这种过度失调的全身性炎症反应造成机体自身组织结构和生理功能的广泛损害, 最终引

起 MODS乃至死亡^[1]。

研究表明, SIRS是 MODS发病的基础, 细胞因子失控性释放是 SIRS向 MODS转化的关键, 细胞因子被认为在 MODS的调节上发挥了重要作用, 其水平能反映 MODS的严重程度^[2]。林建东等^[3]探讨了 MODS中炎症介质 TNF-α 与细胞凋亡的关系, 认为 TNF-α 是始动因子, 引起炎症的级联反应, 诱导淋巴细胞凋亡。一些文献分别探讨了 TNF-α 等细胞因子在有机磷农药中毒引发 MODS中的作用^[4-7]。张在其等^[8]研究了毒鼠强中毒患者血清中 TNF-α 的动态变化。本研究用毒鼠强灌胃复制小鼠中毒导致 MODS模型, 病理组织学证实小鼠各脏器发生了实质性损伤, 表明小鼠发生了多器官功能衰竭。其结果显示, 中毒后 2 h 6 h 12 h 24 h各时间点与对照组比较, 肝脏中 TNF-α 明显升高, 提示炎症反应参与毒鼠强引发 MODS的发病过程。

JAK/STAT信号通道是细胞因子信号传导的重要途径。在 JAK/STAT通道的激活机制明确后, 其反馈调控机制已成为研究热点, 特别是近年来发现一簇被称为细胞因子信号转导抑制因子 (SOCS) 的蛋白质。SOCS家族蛋白从最初发现到目前一直备受关注, 研究人员通过大量的体内外研究逐渐揭示了它们在免疫调节及重大疾病中的作用机制, 业已证明 SOCS1和 SOCS-3是这个家族中主要对免疫系统有作用的因子^[9]。研究显示 SOCS1和 SOCS3能被许多在脓毒症动物中常见的细胞因子和炎症因子所诱导^[10]。SOCS家族蛋白分子在正常细胞中表达量很少, 一旦细胞受到某些细胞因子如 TNF-α 刺激, 其表达量可迅速明显地增加, SOCS含量增加又反馈抑制这些细胞因子的信号转导, 由于细胞因子参与了许多疾病的发病和病理损害过程, 可以推测 SOCS作为靶分子在疾病治疗中具有一定的应用前景。通过抑制 JAK/STAT信号通道而减少炎症因子表达, 减轻器官的损伤, 达到防治 MODS的作用。本研究通过观察毒鼠强小鼠各时间点肝脏中 SOCS3 mRNA表达的变化, 随着时间推移, 与对照组比较表达量普遍增高, 毒鼠强可以诱导 SOCS-3表达。经相关分析显示, 肝脏中 SOCS3和 TNF-α 之间 mRNA表达量呈明显的正相关, 表明两者的表达趋势基本一致。

总之, 随着对 SOCS家族研究的深入, 相信在不久的将来 SOCS家族会具有广阔的发展和前景, 为临床防治 MODS提供了一个新的思路。

参考文献:

[1] Bone RC, Isaac Newton. Sepsis, SIRS and CARS [J]. Crit Care Med 1996, 24 (7): 1125-1128

[2] LIYX, LIC S. Tumornecrosis factorα and vascular endothelial dysfunction in relation to multiple organ dysfunction syndrome [J]. Chin J Emerg Med 2006, 15 (7): 581-584.

[3] 林建东, 肖雄箭, 廖秀玉, 等. 乌司他丁对大鼠脓毒症急性肺损伤外周血淋巴细胞凋亡率及 TNF-α、IL-6水平的影响 [J]. 中华急诊医学杂志, 2008, 17 (3): 252-255

[4] 李艳辉, 姜兴权, 孙宏志, 等. L-6, L-10及 TNF-α 在急性有机磷农药中毒引发 MODS中的作用及临床意义 [J]. 中国急救医学, 2006, 26 (11): 804-805

- [5] 何伟明. 急性有机磷农药中毒合并 MODS血清肿瘤坏死因子- α 水平测定临床意义 [J]. 内科急危重症杂志, 2005, 11 (2): 83-84
- [6] 关永东, 徐辉, 李小利, 等. 重度急性有机磷中毒患者血清 LPS、TNF- α 的变化及与 MODS的相关研究 [J]. 中华急诊医学杂志, 2001, 10 (4): 230-231
- [7] 关永东, 徐辉, 李小利, 等. 急性有机磷患者内毒素和肿瘤坏死因子与多器官功能障碍综合征的相关研究 [J]. 现代临床医学生物工程学杂志, 2001, 7 (1): 33-34
- [8] 张在其, 彭巍, 翁志华, 等. 急性毒鼠强中毒患者血清 B-EP

ET、NO与 TNF- α 的动态变化 [J]. 中华急诊医学杂志, 2004, 13 (11): 774-777.

- [9] Alexander W S. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in the immune system [J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2 (6): 410-416
- [10] Dalpke A H, Oppler S, Zimmermann S, et al. Suppressors of cytokine signaling SOCS-1 and SOCS-3 are induced by CPG-DNA and modulate cytokine response APCs [J]. J Immunol, 2001, 166 (12): 7082-7089

雌二醇和壬基酚对仔鼠神经毒性的联合作用

Neurotoxic effects of nonylphenol and estradiol on offspring rats

许洁^{1,2}, 俞捷¹, 汪洋², 李岩¹, 胡斌丽¹

XU Jie^{1,2}, YU Jie¹, WANG Yang², LI Yan¹, HU Bin Li¹

(1. 遵义医学院预防医学教研室, 贵州 遵义 563003; 2. 重庆医科大学公共卫生学院, 重庆 400010)

摘要: 探讨母体雌二醇 (estradiol, E_2) 和壬基酚 (nonylphenol, NP) 联合暴露对仔鼠神经系统发育的影响, 并初步探讨 E_2 和 NP 的联合毒性作用。将孕鼠随机分为 7 组, 花生油溶剂对照组, NP 染毒低、高剂量组 (50、100 mg/kg), E_2 染毒低、高剂量组 (10、20 μ g/kg), NP+ E_2 联合染毒低、高剂量组 (NP50 mg/kg+ E_2 10 μ g/kg, NP100 mg/kg+ E_2 20 μ g/kg 组), 每组 6~7 只孕鼠, 妊娠第 9~15 天灌胃染毒。观察母鼠生产指标 (产仔数、活产数); 仔鼠神经行为发育指标 (平面翻正、空中翻正、听觉惊愕和视觉定向); 用 Morris 水迷宫观察学习记忆; 检测垂体和海马组织乙酰胆碱酯酶 (AChE) 和胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 的活性。与对照组和单独染毒组比较, 联合染毒低、高剂量组孕鼠产仔数、活产数减少, 仔鼠断崖回避、平面翻正、空中翻正、听觉惊愕和视觉定向发育时间推迟, 水迷宫实验中逃避潜伏期延长, 穿越平台次数减少; 跳台实验中反应时间延长, 步下潜伏期缩短, 错误次数增加, 海马组织 ChAT 活性下降, AChE 活性上升, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示孕期暴露壬基酚和雌二醇联合作用可影响仔鼠神经发育, 二者的神经毒性表现为相加作用。

关键词: 雌二醇; 壬基酚; 仔鼠; 神经毒性; 联合作用

中图分类号: R996.0625.311 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2011)04-0288-04

壬基酚 (nonylphenol, NP) 作为乳化剂被广泛应用于数十个行业生产中, 其作为环境内分泌干扰物 (environmental endocrine disruptors, EEDs) 对机体的毒性是当今深受关注的研究热点^[1]。研究表明 NP 这类雌激素样物质具有神经毒

性^[2-6], 随着近年来雌激素制剂 (如口服避孕药) 的大规模临床应用以及 EEDs 的广泛存在, 两者对人体的联合作用机会大大增加。目前国内外未见关于两者对机体的神经系统联合作用的报道, 为此, 本课题选择亲代孕期暴露于壬基酚和雌二醇的仔鼠作为研究对象, 研究壬基酚和雌二醇单独和混合后对其神经系统发育及神经行为和学习记忆的影响, 测定仔鼠海马和垂体组织中乙酰胆碱酯酶和胆碱乙酰转移酶的活性及体内激素水平的变化, 确定两者的联合作用类型, 初步探讨其可能的作用机制, 为真实反映二者共存对哺乳动物神经系统可能造成的损害作用以及为后续的实验研究提供科学的依据。

1 材料与与方法

1.1 试剂和仪器

壬基酚和 β 雌二醇 (东京化成工业株式会社 Tokyo Chemical Industry), 纯度 99%; AChE 和 ChAT 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 睾酮及雌二醇试剂盒 (北京北方生物技术研究所)。分光光度计 (上海电化仪表自控公司 721-A), 高速电动匀浆器 (上海浦东物理光学仪器厂 FSH-2), 电子天平 (上海精密科学仪器厂 EA1004N), Morris 水迷宫监测系统 (成都泰盟科技有限公事), γ 放射免疫计数器 (中科大中佳公司)。

1.2 实验动物与分组

(260 \pm 20) ♂雄性及 (180 \pm 10) ♀雌性清洁级 SD 大鼠 (用于交配) 共 100 只, 购于第三军医大学 (动物合格证号: SCXK (渝) 20070005)。饲养于相对湿度 (60 \pm 5)%, 温度 (28 \pm 2) $^{\circ}$ C 的环境中, 自然通风, 12 h 光照 12 h 黑暗, 自由取食、饮水。

大鼠按雌:雄 (2:1) 同笼交配, 次日晨将雌鼠逐一阴道涂片镜检发现精子当日记为孕期 0 d。将交配成功的孕鼠随机分配到 7 组: 即花生油溶剂对照组和 NP 染毒低、高剂量组 (50、100 mg/kg), E_2 染毒低、高剂量组 (10、20 μ g/kg),

收稿日期: 2011-01-28 修回日期: 2011-05-20

基金项目: 贵州省自然科学基金 (黔科 2019 号); 遵义市自然科学基金 (遵市科合社字 200805); 遵义医学院院基金 (2007-61-22)

作者简介: 许洁 (1979-), 女, 研究方向: 毒理学。