

• 论著 •

细胞因子信号转导抑制因子-1 在脓毒症小鼠 肝脏和脾脏中表达的研究

赵锋 潘雯 梁艳冰 唐皓 陈志斌 林妙霞 杨晓燕 周伟雄 马中富

【摘要】 目的 观察细胞因子信号转导抑制因子-1(SOCS1)在脓毒症小鼠肝脏和脾脏中的变化情况,探讨 SOCS 在体内的可能作用机制。方法 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症小鼠模型。提取肝脏和脾脏组织的总 RNA 及蛋白,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术测定组织中 SOCS1 mRNA 的相对含量;用免疫印迹法测定组织中 SOCS1 相对蛋白含量;用 SPSS 统计软件分析上述指标之间的变化关系。结果 脓毒症小鼠术后 6 h 肝组织 SOCS1 的基因和蛋白表达均迅速升高,基因表达至 24 h 达到高峰($P < 0.05$),蛋白表达一直保持高位;在脾脏中仅检测到 SOCS1 基因表达,随时间延长逐渐上升,并一直保持高位;肝脏中 SOCS1 的基因和蛋白表达量间呈明显正相关($y = 0.110 \pm 5.765 \times 10^{-3}x$, $r = 0.837$, $F = 93.309$, $P < 0.01$)。结论 CLP 导致的脓毒症可诱导 SOCS1 在肝脏和脾脏中进一步表达,提示 SOCS1 在脓毒症出现后的免疫变化中有重要作用,可利用它们对脓毒症进行干预,以改善脓毒症的预后。

【关键词】 脓毒症; 细胞因子信号转导抑制因子; 肝脏; 脾脏

Study on the expression of suppressors of cytokine signaling - 1 in liver and spleen of septic mice ZHAO Feng*, PAN Wen, LIANG Yan-bing, TANG Hao, CHEN Zhi-bin, LIN Miao-xia, YANG Xiao-yan, ZHOU Wei-xiong, MA Zhong-fu. * Department of Emergency, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong, China
Corresponding author: MA Zhong-fu (Email: mazhongfu05@sohu.com)

【Abstract】 **Objective** To investigate the change in suppressors of cytokine signaling - 1 (SOCS1) gene in the liver and the spleen of septic mouse, and to find out its probable mechanisms of action in sepsis. **Methods** Cecal ligation and puncture (CLP) was adopted to reproduce sepsis model. The liver and the spleen tissues were harvested and RNA and protein were respectively extracted. The contents of the regulatory genes SOCS1 mRNA were determined by reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR) and regulatory content of protein was detected by Western blotting. The SPSS statistics software was adopted to calculate the correlation. **Results** The expressions of SOCS1 on gene and protein in the liver were markedly upregulated at 6 th hour. The gene expression peaked at the 24 th hour ($P < 0.05$). The expression of protein was persistently high. However, the expression of SOCS1 was only detected in the spleen, and it obviously rose in strength with the passage of time, and it remained in a high level. By statistical analysis, positive correlations were found between the gene and protein expressions of SOCS1 ($y = 0.110 \pm 5.765 \times 10^{-3}x$, $r = 0.837$, $F = 93.309$, $P < 0.01$). **Conclusion** CLP induced sepsis can induce the up - regulation of the expressions of SOCS1, indicating that SOCS1 play important role in the change in immune system in sepsis. They may be used to intervene sepsis so as to improve the outcome of sepsis.

【Key words】 sepsis; suppressors of cytokine signaling - 1; liver; spleen

脓毒症(sepsis)和多器官功能障碍综合征(MODS)是当今国际医学界共同瞩目的研究热点。作为调控炎症反应的关键环节,细胞信号转导系统以其数量少、但作用广泛的特点吸引了人们的注意,

基金项目:广东省广州市科委重点攻关课题(2001-Z-130-02);广东省医学科研基金资助项目(A2003176)

作者单位:510630 广东广州,中山大学附属第三医院急诊科(赵锋,潘雯,林妙霞,杨晓燕,周伟雄);中山大学附属第一医院普内科(梁艳冰,唐皓,陈志斌,马中富)

通讯作者:马中富,教授,博士生导师,主任医师(Email: mazhongfu05@sohu.com)

作者简介:赵锋(1956-),男(汉族),湖南省人,副主任医师,研究方向为急诊危重病监护与治疗。

细胞因子信号转导抑制因子(SOCS)就是其中的一员。SOCS 家族蛋白,是一类可被多种细胞因子诱导产生,反过来又能以负反馈方式对信号转导途径进行抑制调节的蛋白分子。细胞培养模式,基因工程小鼠、各种损伤动物模型等体内及体外实验均证明 SOCS1 是这个家族中少有的对免疫系统有作用的成员,我们认为它与 MODS、脓毒症的发生发展也可能有密切关系。因此,本研究中拟用盲肠结扎穿孔术(CLP)致 MODS 为研究模型,采用分子生物学等技术,通过观察 SOCS1 在小鼠肝脏和脾脏中的变化,明确 SOCS1 与脓毒症的关系及其意义,探讨 SOCS1 在体内的可能作用机制,从而为 MODS 的

治疗提供新的策略。

1 材料与与方法

1.1 动物模型:SPF 级健康雄性 BALB/c 小鼠,体重 22~27 g,由中山大学北校区动物实验中心提供。CLP 后多种微生物感染脓毒症动物模型的建立参照文献[1]方法进行,术前禁食 12 h,采用体积分数为 10%的水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉。腹部正中切口,分离回肠和盲端,在距回肠盲端 1.5~2.0 cm 处环形结扎盲肠根部,同时保持肠道畅通。在回肠盲端用 9 号针头贯穿穿刺肠壁 2 次,关闭腹腔。术后皮下注射生理盐水 50 ml/kg。该模型 72 h 动物死亡率约 75%,符合要求。

1.2 实验分组:共 42 只小鼠,按随机数字表法分为 7 组:正常对照组、假手术组、以及 CLP 后 2、6、12、24 和 48 h 组,每组 6 只。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 SOCS1 mRNA 表达:无菌留取肝、脾组织约 50 mg,以异硫氰酸胍一步法提取细胞总 RNA (美国 MBI 公司试剂盒)。采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术对转录产物进行扩增,以 β -actin 作为内参对照。引物序列:① β -actin (330 bp):上游引物为 5'-AAG ATC ATT GCT CCT CCT GAG-3',下游引物为 5'-GAG TCA AAA GCG CCA AAA C-3';② SOCS1 (135 bp):上游引物为 5'-TTG TAG CAG CTT GTG TCT GG-3',下游引物为 5'-GGA TAT TCT GCA CAG CAG AA-3'。取 10 μ l 扩增产物,于质量分数为 1%的琼脂糖凝胶中电泳,采用凝胶成像和化学发光图像分析系统,测定电泳条带的吸光度(A)值,以 β -actin 为内参照,计算 SOCS1 条带与 β -actin 的 A 值比值,即为扩增产物定量相对值。

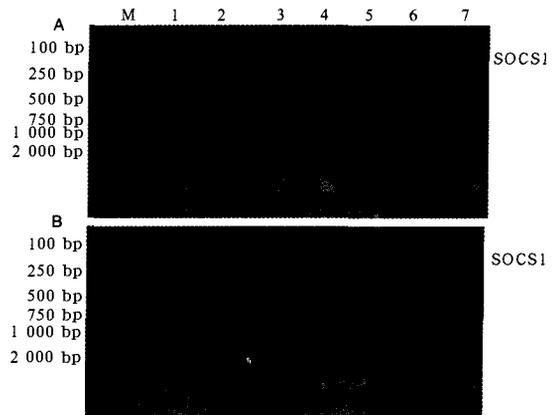
1.3.2 SOCS1 蛋白表达:用组织裂解液提取蛋白后,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min(离心半径 5.8 cm)离心 20 min,加入 5 \times 上样缓冲液,煮沸,用质量分数为 10%的分离胶行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,30 V 电压电转移,于冷库中 4 $^{\circ}$ C 过夜,封闭 1 h 后加入一抗(SOCS1、羊抗鼠多克隆抗体,稀释度 1:100,购于 Santa Cruz, USA),4 $^{\circ}$ C 摇床过夜。加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗鼠二抗(稀释度 1:2 000),室温孵育 1 h。加入发光液 LumiGLO,暗室中曝光,采用光密度扫描仪采集 X 线片上的实验结果图像,以测定其感光密度。取 CLP 24 h 组的条带为标准条带,设定其单位数值为 100,其他条带数值即为(感光密度/标准条带的

感光密度) \times 100。

1.4 统计学分析:全部数据用 SPSS11.0 统计软件处理,以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组间比较用方差分析,相关分析用简单相关分析法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测结果(图 1,表 1):正常对照组和假手术组小鼠肝组织 SOCS1 mRNA 几乎无表达,术后 2 h 仅有微量表达,术后 6 h 迅速上升,术后 12 h 和 24 h SOCS1 mRNA 表达量逐渐升高,至 24 h 达高峰,为正常对照组的 6.8 倍,术后 48 h 其表达量较 24 h 下降。正常对照组和假手术组小鼠脾脏细胞 SOCS1 mRNA 也低至不可探测,术后 2 h 迅速上升,之后 SOCS1 mRNA 表达量逐渐升高,至 48 h 仍维持较高水平(P 均 <0.05)。



A: 肝脏;B: 脾脏;M: Marker;1~7 依次为:正常对照组、假手术组及 CLP 后 2、6、12、24 和 48 h 组

图 1 RT-PCR 检测脓毒症小鼠肝脏和脾脏 SOCS1 基因的表达量
Figure 1 Image of gene expression of SOCS1 in septic mice's liver and spleen detected by RT-PCR

表 1 各组脓毒症小鼠肝脏和脾脏 SOCS1 mRNA 的表达量变化($\bar{x}\pm s$)

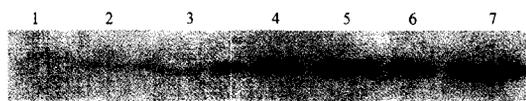
Table 1 Expression of SOCS1 mRNA in liver and spleen of septic mice in each group($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	肝脏	脾脏
正常对照组	6	0.130 \pm 0.017	0.020 \pm 0.007
假手术组	6	0.150 \pm 0.021	0.030 \pm 0.006
CLP 2 h 组	6	0.250 \pm 0.014	0.160 \pm 0.003 $\star\Delta$
CLP 6 h 组	6	0.530 \pm 0.013 $\star\Delta$	0.180 \pm 0.008 $\star\Delta$
CLP 12 h 组	6	0.640 \pm 0.016 $\star\Delta$	0.200 \pm 0.005 $\star\Delta$
CLP 24 h 组	6	0.880 \pm 0.017 $\star\Delta$	0.210 \pm 0.008 $\star\Delta$
CLP 48 h 组	6	0.780 \pm 0.016 $\star\Delta$	0.210 \pm 0.012 Δ
F 值		84.558	715.456
P 值		<0.01	<0.01

注:与正常对照组比较: $\star P<0.05$;与假手术组比较: $\Delta P<0.05$

2.2 Western blotting 结果(图 2,表 2):正常对照组和假手术组及 CLP 后 2 h 小鼠肝组织 SOCS1 蛋

白几乎无表达,术后 6 h 即迅速上升,之后表达量逐渐升高,至 48 h 未出现明显下降,一直保持高位,最高为正常对照组的 5.9 倍。小鼠脾脏细胞 SOCS1 蛋白在任意时间点皆未测出。



1~7 依次为:正常对照组、假手术组及
CLP 后 2、6、12、24 和 48 h 组

图 2 Western blotting 检测脓毒症小鼠肝脏 SOCS1 蛋白表达量
Figure 2 Expression of SOCS1 image of protein in septic mice's
liver detected by Western blotting

表 2 各组脓毒症小鼠肝脏和脾脏 SOCS1
蛋白的表达量变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Expression of SOCS1 protein in liver and
spleen of septic mice in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	肝脏	脾脏
正常对照组	6	17.00 ± 6.55	…
假手术组	6	20.00 ± 4.67	…
CLP 2 h 组	6	20.00 ± 5.87	…
CLP 6 h 组	6	96.00 ± 13.61*△	…
CLP 12 h 组	6	96.00 ± 15.44*△	…
CLP 24 h 组	6	100.00 ± 0.00*△	…
CLP 48 h 组	6	97.00 ± 21.53*△	…
F 值		95.333	
P 值		<0.01	

注:与正常对照组比较;* $P < 0.05$;与假手术组比较;△ $P < 0.05$;
…为未发现

2.3 相关性分析:肝脏中 SOCS1 mRNA 表达量与 SOCS1 蛋白表达量间呈明显正相关($y = 0.110 + 5.765 \times 10^{-3}x$, $r = 0.837$, $F = 93.309$, $P < 0.01$),提示蛋白与基因的表达量基本一致。

3 讨论

脓毒症以及多器官功能衰竭(MOF)是手术和创伤重症加强治疗病房(ICU)患者的主要死亡原因。在临床和动物实验中,脓毒症自身表现为生理上和免疫上的两个阶段。免疫系统中,在全身免疫细胞反应性降低的条件下有一个初发、放大的全身炎症反应。除了细菌产物外,细胞因子被认为在脓毒症的调节上发挥了重要作用,他们的水平反映了脓毒症的发展程度^[2]。脓毒症期间各种炎症和(或)感染刺激激活广泛的信号转导通路,其中许多通路能被产生的受体和蛋白所调节。虽然目前我们对细胞激活的负性调节机制所知不多,但已有的研究证明,脓毒症小鼠取出的免疫细胞在体外实验中对内毒素的刺激表现出抑制反应^[3]。最近发现 SOCS 蛋白家族对脓毒症期间由细胞因子介导的反应有负性调节作用。虽然 SOCS 蛋白被首先证明是 JAK-STAT 路

径的抑制剂,但其家族中也有参与提升信号蛋白退化的细胞信号,并且与其他许多信号转导因子都有联系。系列研究表明,SOCS 蛋白在脓毒症出现后的免疫抑制方面有作用。在脂多糖(LPS)诱导动物模型中无论是体外还是体内实验,都表明 SOCS 蛋白是 LPS 耐受的关键介质^[4-6];在脓毒症免疫反应中 SOCS 也很重要,SOCS 蛋白在 T 细胞分化至 T 辅助细胞分型(Th1/SOCS1, Th2/SOCS3)时也有重要作用^[7]。最后,SOCS 蛋白还通过调节 Bcl-2 家族成员来调节细胞凋亡^[8];Hotchkiss 等^[9]发现,在脓毒症患者和老鼠的免疫细胞中,凋亡数量均上升;另外,该研究还发现,从脓毒症小鼠中分离出的巨噬细胞对 LPS 刺激产生的细胞因子有抵抗作用,这种抑制与其凋亡增多的倾向有关。

本研究是为了说明 CLP 所致多重细菌脓毒症诱导的 SOCS 表达,结果与预料的一致,即 CLP 可诱导 SOCS1 表达,而且表现出时间和细胞特异性,这使我们对其在免疫系统中的作用更感兴趣。从本组实验中可以看出:小鼠肝组织 SOCS1 mRNA 在正常对照组和假手术组仅有微量表达,术后 6 h 即迅速上升,之后表达量逐渐升高,至 24 h 达到高峰,为正常对照组的 6.8 倍,术后 48 h 其表达量较 24 h 明显下降。蛋白表达量较基因无明显滞后,术后 6 h 即迅速上升,之后表达量逐渐升高,至 48 h 仍未出现明显下降,一直保持高位,最高为正常对照组的 5.9 倍。很明显,SOCS1 受其他因素影响较小,而对脓毒症的刺激相对较敏感。最近 Nakagawa 等^[5]发现巨噬细胞在受到 LPS 刺激时可迅速诱导产生 SOCS1,SOCS1 缺陷小鼠对 LPS 诱导的休克高度敏感,且炎症细胞因子的水平升高,SOCS1 预处理可抑制 LPS 诱导的核转录因子- κ B(NF- κ B)及转录活化蛋白 1(STAT1)活化,而且 SOCS1 缺陷小鼠不会出现 LPS 耐受(即二次接受 LPS 刺激时的无反应状态)。上述结果表明,SOCS1 是机体对感染刺激的重要负调节因子。我们还发现,蛋白出现后迅速升高,一直保持较高水平的表达,与基因表达曲线不同步,考虑可能是转录水平受到调控。现已明确,STAT 家族对 SOCS1 表达的上调有重要意义。SOCS1 基因的启动子包含有 STAT1、STAT3 及 STAT6 的结合点,STAT 通过与 SOCS1 基因的启动子结合而调节其表达,抑制 STAT3 的作用可以抑制白细胞介素-6(IL-6)或白血病抑制因子(LIF)诱导的 SOCS1 mRNA 表达^[10]。

小鼠脾脏细胞 SOCS1 mRNA 与肝脏同步,在

正常对照组和假手术组几乎无表达,术后 2 h 开始出现,之后表达量逐渐升高,48 h SOCS1 mRNA 表达量仍维持较高水平,但其蛋白表达却始终低至测定不出。Gregorieff 等^[11]发现,在小鼠胸腺 T 细胞中,内源性 SOCS1 蛋白水平很低,而 SOCS1 的转录子水平却较高,SOCS1 的表达在翻译起始阶段可被明显抑制。结构和功能分析表明,该抑制效应是由 SOCS1 基因的 5' 端非翻译区(5' UTR)介导的,该区域上游的两个 AUG 序列对其抑制作用尤为重要。提示在细胞免疫器官中,除了通过转录水平调节 SOCS 生物学活性外,蛋白合成水平调节也十分重要。不过这种现象也有可能是因为脾脏蛋白含量较低以致于测不到而产生的。

脓毒症时 SOCS 产生的机制我们并不清楚,对 SOCS3 的翻译调控研究发现,当细胞受到生理或环境压力时,SOCS3 的翻译从第 12 个氨基酸 Met 处起始,由于缺失了 N 端的泛素化位点 Lys6,这种蛋白质和缺失了 C 端的 SOCS 框一样,泛素化作用减弱,而稳定性则大大增强,对细胞因子信号通路的阻断作用也加强^[12]。最近的研究热点是 SOCS3 通过改变 T 细胞的分化方向在炎症疾病中发挥作用。对 SOCS3 组织特异性功能缺失研究发现,它可以增加 IL-6 对肥大细胞的刺激强度,延长 STAT3 的活化时间,并导致基因表达谱变化,最终使得 IL-6 的细胞学效应发生质的变化,即由通常的炎症信号变成了抗炎症信号^[13]。SOCS3 也可与活化的细胞因子受体结合,但并不与 STAT5b 竞争。与 SOCS1 相比,SOCS3 对 JAK 激酶的抑制作用很弱,但当 SOCS3 与细胞因子受体结合后,其抑制作用会明显增强。SOCS1 通过抑制 STAT1 丝氨酸和酪氨酸磷酸化而抑制 LPS 的信号转导,并且这种抑制是不依赖 MyD88 和其他蛋白质因子的一种直接抑制。SOCS1 也作用于 NF- κ B 途径中的信号分子,抑制 LPS 诱导的 NF- κ B 途径^[14]。SOCS1 是 JAK/STAT 通路的重要负调控蛋白之一,可与 JAK1、JAK2、JAK3 及非受体酪氨酸激酶 2(TYK2)直接结合,抑制这些激酶的催化活性。

现在我们最大的问题是了解 SOCS1 在脓毒症时的作用。按照现有的知识,SOCS 的主要功能是抑制 JAK/STAT 通路。现已明确,SOCS1 在细胞系中的过量表达可抑制众多细胞因子、激素和生长因子的信号转导。SOCS 表达应该是病理的,是被用来控制免疫反应的。结合我们当初的设想,SOCS 应该是全身炎症反应综合征(SIRS)和代偿性抗炎反应综

合征(CARS)冲突中的平衡者,其表达的增多和减少将对控制病情有怎样的影响,这些我们还不能回答。新的研究方法和需要被引入,这在 SOCS 未来的功能研究中也是一个不小的挑战。

参考文献:

- 1 马中富,乐胜,梁艳冰,等.p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂对脓毒症大鼠多器官损伤的保护作用研究[J].中国危重病急救医学,2005,17(4):211-213.
- 2 Ebong S,Call D,Nemzek J,et al.Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity [J]. Infect Immun,1999,67(12):6603-6610.
- 3 Ayala A,Chaudry JH.Immune dysfunction in murine polymicrobial sepsis: mediators macrophages lymphocytes and apoptosis [J]. Shock,1996,6(Suppl 1):S27-38.
- 4 Berlato C,Cassatella M A,Kinjo I,et al. Involvement of suppressor of cytokine signaling - 3 as a mediator of the inhibitory effects of IL - 10 on lipopolysaccharide - induced macrophage activation [J]. J Immunol, 2002, 168 (12) : 6404 - 6411.
- 5 Nakagawa R,Naka T,Tsutsui H,et al. SOCS - 1 participates in negative regulation of LPS responses [J]. Immunity, 2002, 17 (5) : 677 - 687.
- 6 Kinjo I,Hanada T,Inagaki-Ohara K,et al. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS - induced macrophage activation [J]. Immunity, 2002, 17 (5) : 583 - 591.
- 7 Egwuagu C E,Yu C R,Zhang M,et al. Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance [J]. J Immunol, 2002, 168 (7) : 3181 - 3187.
- 8 Ketteler R,Moghaby C S,Hsiao J G,et al. The cytokine - inducible Scr homology domain - containing protein negatively regulates signaling by promoting apoptosis in erythroid progenitor cells [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (4) : 2654 - 2660.
- 9 Hotchkiss R S,Tinsley K W,Swanson P E,et al. Sepsis - induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4⁺ T lymphocytes in humans [J]. J Immunol, 2001, 166 (11) : 6952 - 6963.
- 10 Saito H,Morita Y,Fujimoto M,et al. IFN regulatory factor - 1 mediated transcriptional activation of mouse STAT induced STAT inhibitor - 1 gene promoter by IFN - gamma [J]. J Immunol, 2000, 164 (11) : 5833 - 5843.
- 11 Gregorieff A,Pyronnet S,Sonenberg N,et al. Regulation of SOCS - 1 expression by translational repression [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (28) : 21596 - 21604.
- 12 Sasaki A,Inagaki-Ohara K,Yoshida T,et al. The N - terminal truncated isoform of SOCS3 translated from an alternative initiation AUG codon under stress conditions is stable due to the lack of a major ubiquitination site, Lys - 6 [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (4) : 2432 - 2436.
- 13 Seki Y,Inoue H,Nagata N,et al. SOCS - 3 regulates onset and maintenance of T (H) 2 - mediated allergic responses [J]. Nat Med, 2003, 9 (8) : 1047 - 1054.
- 14 Kubo M,Hanada T,Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity [J]. Nat Immunol, 2003, 4 (12) : 1169 - 1176.

(收稿日期:2007-04-02 修回日期:2007-09-17)

(本文编辑:李银平)