

## 糖皮质激素诱导亮氨酸拉链蛋白与炎症反应关系的研究

白祥军 李波 王海平 杨朝晖 李思齐

**【摘要】** 目的 探讨糖皮质激素诱导的亮氨酸拉链蛋白(GILZ)在炎症反应过程中的作用机制。方法 采用无血清RPMI1640培养基分两组培养人单核细胞株THP-1细胞,其中刺激组加入地塞米松(DEX)刺激,而对照组仅加无血清RPMI1640培养基。12 h后提取两组细胞总RNA和总蛋白;用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法在转录水平半定量检测GILZ基因;用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)在翻译水平检测核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)p65与激活蛋白-1(AP-1)的蛋白表达。收集10例临床创伤患者[创伤严重度评分(ISS) $\geq 16$ 分]伤后24 h内的外周血,提取白细胞后分为刺激组和对照组,对照组给予无血清RPMI1640培养基,刺激组在对照组的基础上加入DEX刺激,培养12 h后提取白细胞总RNA和总蛋白;用RT-PCR方法在转录水平半定量检测GILZ基因;用Western blotting方法在翻译水平检测NF- $\kappa$ B p65与AP-1的蛋白表达。结果 在DEX刺激下,DEX刺激组THP-1细胞和创伤患者外周血白细胞GILZ mRNA表达水平均较对照组升高( $P$ 均 $< 0.01$ );DEX刺激组NF- $\kappa$ B p65与AP-1蛋白在THP-1细胞和创伤患者外周血白细胞的表达水平均低于对照组( $P$ 均 $< 0.01$ )。结论 糖皮质激素可上调GILZ基因表达;GILZ的高表达可以抑制NF- $\kappa$ B与AP-1的活性,具有抗炎反应的作用。

**【关键词】** 糖皮质激素; 地塞米松; 亮氨酸拉链蛋白; 核转录因子- $\kappa$ B; 激活蛋白-1; 全身炎症反应综合征

**Primary investigation of the relationship between glucocorticoid induced leucine zipper and inflammatory reaction** BAI Xiang-jun, LI Bo, WANG Hai-ping, YANG Zhao-hui, LI Si-qi. Department of Trauma Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the mechanism of the action of glucocorticoid induced leucine zipper (GILZ) in inflammatory reaction. **Methods** Human monocyte cell line THP-1 cells were divided into two groups and cultured in nonserum RPMI1640 medium. In one group the cells were treated with dexamethasone (DEX). Twelve hours later total RNA and total protein were abstracted in both two groups. The mRNA encoding for expression of GILZ was semiquantitatively detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Protein expression of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 and activator protein-1 (AP-1) were assessed by Western blotting. Peripheral blood of 10 trauma patients [injury severity score (ISS)  $\geq 16$  scores] were collected and the leukocytes were isolated within 24 hours after trauma. The leukocytes were divided into two groups and cultured in nonserum medium. In one group the cells were treated with DEX. Twelve hours later total RNA and total protein were abstracted in both two groups. The mRNA encoding for expression of GILZ was semiquantitatively detected by RT-PCR. Protein expression of NF- $\kappa$ B p65 and AP-1 were assessed by Western blotting. **Results** Stimulated by DEX, the expression of GILZ mRNA was increased both in THP-1 cells and the leukocytes of trauma patients compared with those of control groups (both  $P < 0.01$ ). Whereas, protein expressions of NF- $\kappa$ B p65 and AP-1 of THP-1 cells and leukocytes in peripheral blood of trauma patients were decreased in the stimulation groups compared with those of control groups (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion** The expression of GILZ gene is up-regulated by glucocorticoid. Overexpression of GILZ inhibits NF- $\kappa$ B and AP-1 activities, suggesting that GILZ possesses anti-inflammatory function.

**【Key words】** glucocorticoid; dexamethasone; leucine zipper; nuclear factor- $\kappa$ B; activator protein-1; systemic inflammatory response syndrome

糖皮质激素诱导的亮氨酸拉链蛋白(glucocor-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371465)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院创伤外科

作者简介:白祥军(1963-),男(汉族),湖北省京山人,医学博士,主任医师。

ticoid induced leucine zipper, GILZ)最初作为一种对地塞米松(DEX)敏感的基因而从胸腺细胞DNA消减文库中分离出来<sup>[1]</sup>。GILZ可介导T细胞受体(T cell receptor, TCR)的激活,抑制淋巴细胞Fas/FasL和白细胞介素-2(IL-2)的表达,调节T细胞的激活和凋亡<sup>[2-5]</sup>,也可抑制Raf-1活性<sup>[6]</sup>,同时参

与内皮细胞的应激<sup>[7]</sup>,具有广泛的免疫抑制作用。近年来研究显示,GILZ 与核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和激活蛋白-1(activator protein-1,AP-1)之间有密切的联系。NF- $\kappa$ B 和 AP-1 是两个重要的促炎转录因子,它们的激活可导致大量促炎因子释放,加重炎症反应,两者在全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome,SIRS)中起枢纽作用。因此,研究如何抑制 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 的激活,减少促炎基因表达,从而减轻组织损伤和炎症反应,以此改善 SIRS 患者预后,减少多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome,MODS)的发生具有重要意义。本实验从分子生物学水平初步探讨 GILZ 与 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 的关系,为进一步了解 GILZ 在炎症反应中所发挥的作用奠定基础。

## 1 资料与方法

**1.1 试剂:**人单核细胞株 THP-1(武汉大学细胞所),RPMI1640 培养基(美国 Hyclone 公司),DEX(美国 Sigma 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),红细胞裂解液(Tris-NH<sub>4</sub>Cl,自配),三去污细胞裂解液(自配),一步法总 RNA 提取试剂(Trizol,上海华舜公司),兔抗人 NF- $\kappa$ B p65 一抗(武汉博士德公司),逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)两步法试剂盒(大连宝生物工程有限公司),兔抗人 AP-1 一抗(美国 Sants Crue 公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(北京中山生物技术公司),硝酸纤维素膜(美国 3COM 公司),增强化学发光(ECL)试剂盒(美国 Pierce Biotechnology 公司)。

**1.2 临床标本收集和處理:**按随机原则选择本院 2005 年 9—10 月收治的创伤患者共 10 例,其中男 7 例,女 3 例;年龄 24~55 岁,平均 36.5 岁;创伤严重程度评分(ISS) $\geq 16$  分。实际入选标准:本次受伤前 1 个月内无感染性疾病及激素类药物服用史;受伤至就诊时间 $< 24$  h。于入院后抽取外周血 5 ml,肝素抗凝,应用红细胞裂解液提取白细胞后,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 1 次,分为刺激组和对照组。对照组给予无血清 RPMI1640 培养基;刺激组中加入含 DEX 的无血清 RPMI1640 培养基。

**1.3 THP-1 细胞培养及培养液制备:**将人单核细胞株 THP-1 细胞加入含体积分数为 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,37℃、体积分数为 5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中,2 d 传代 1 次。实验前将细胞分为两组,更换为无血清的 RPMI1640 培养基,静置 12 h 后,倒掉培养基,其中刺激组加入含 DEX 的无血清

RPMI1640 培养基,调整终浓度为 10<sup>-6</sup> mol/L。对照组加无血清 RPMI1640 培养基培养 12 h。

**1.4 引物设计:**引物设计参照 Genbank 中所查阅的 GILZ cDNA 全长序列,应用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计 GILZ 基因引物,于引物上下游分别引入 BamH I 和 Xba I 酶切位点及保护性碱基。上游引物:5'-CGGGATCCAGCCATGAACA-CCGAAAT-3';下游引物:5'-GCTCTAGAGCC-ACTTACACCGCAGA-3';扩增片段长度 418 bp。人  $\beta$ -actin 为内参照物,上游引物:5'-CCAAGG-CCAACCGCGAGAAGATGAC-3';下游引物:5'-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3';扩增片段长度 592 bp。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

**1.5 RT-PCR:**经上述处理后在相应时间点搜集细胞,Trizol 一步法提取总 RNA,RT-PCR 按试剂盒说明书步骤进行。GILZ PCR 反应条件为:94℃变性 5 min 后开始循环,94℃变性 30 s,58℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共 38 个循环,最后 72℃延伸 10 min。 $\beta$ -actin PCR 反应条件为:94℃变性 5 min 后开始循环,94℃变性 30 s,58℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共 36 个循环,最后 72℃延伸 10 min。PCR 反应产物电泳后,采用 Bandscan 凝胶分析软件进行半定量分析,计算 GILZ 与  $\beta$ -actin 吸光度比值( $A_{GILZ}/A_{\beta-actin}$ )。

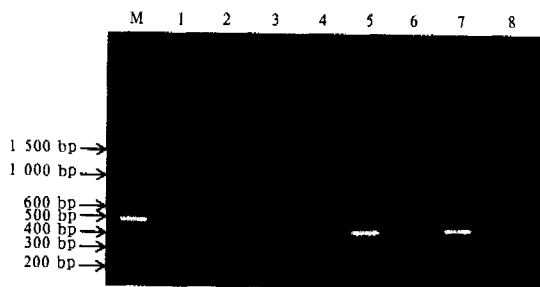
**1.6 蛋白质免疫印迹法(Western blotting):**经上述处理后在相应时间点搜集细胞,用冰的 PBS 洗涤 2 次,加入预冷的三去污细胞裂解液,冰浴 30 min,低温 12 000 $\times g$  离心 15 min,取上清液,测定蛋白浓度。取总蛋白 60  $\mu$ g,加入等体积上样缓冲液,100℃煮沸 5 min,质量分数为 8%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白(积层胶电压 80 V,分离胶电压 120 V),电泳结束后,将蛋白转印到硝酸纤维素膜上(9 V,1.5 h),再用体积分数为 5%的脱脂奶粉液[Tris 缓冲液+体积分数为 0.1%的吐温(Tween)20,用 TBST 溶解]室温下封闭 60 min,TBST 洗膜 3 次 $\times 15$  min,加入用 TBST 稀释的 NF- $\kappa$ B p65 一抗(1:300)、AP-1 一抗(1:200),4℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次 $\times 15$  min,结合 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:3 000)并同时加入内参照物三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次 $\times 15$  min。此后按 ECL 显色试剂盒说明书操作,曝光胶片。

**1.7 统计学分析:**采用 SPSS11.5 统计软件进行数

据处理。结果以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

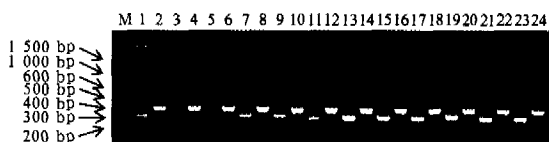
**2.1 RT-PCR 检测结果(图 1,图 2):**THP-1 细胞和人外周血白细胞经 RT-PCR 扩增后,GILZ 扩增产物于 20 g/L 琼脂糖凝胶上电泳显示 410 bp 条带,与预期长度(418 bp)一致; $\beta$ -actin 条带 600 bp,与预期长度(592 bp)一致。



1,3 为对照组;2,4,6,8 为  $\beta$ -actin 内参照物;  
5,7 为 DEX 刺激组;M 为 100 bp Marker

**图 1 GILZ 在 THP-1 细胞中的表达**

**Figure 1 Expression of GILZ in THP-1 cells**



1,3,5,7,9,11 为对照组;13,15,17,19,21,23 为 DEX 刺激组;  
2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24 为  $\beta$ -actin 内参照物;  
M 为 100 bp Marker

**图 2 GILZ 在创伤患者外周血白细胞中的表达**

**Figure 2 Expression of GILZ of leukocytes in peripheral blood of trauma patients**

**2.2 半定量 RT-PCR 分析 GILZ mRNA 表达水平(表 1):**DEX 刺激组 GILZ mRNA 在 THP-1 细胞和创伤患者外周血白细胞中的表达均高于对照组,差异均有显著性( $P$  均  $<0.01$ )。

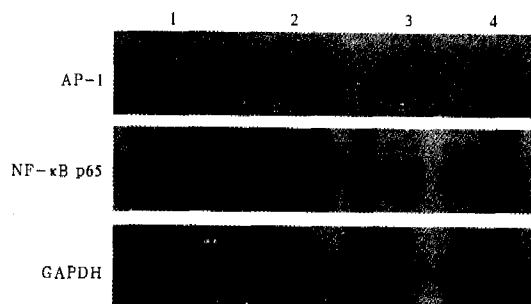
**表 1 半定量 RT-PCR 分析 GILZ mRNA 表达水平( $\bar{x}\pm s$ )**

**Table 1 Expression of GILZ mRNA detected by semiquantity RT-PCR( $\bar{x}\pm s$ ) A 值**

组别	THP-1 细胞	创伤患者外周血白细胞
	GILZ/ $\beta$ -actin	GILZ/ $\beta$ -actin
对照组	1.157 3±0.073 6	0.485 9±0.127 1
刺激组	2.422 7±0.021 6*	1.068 8±0.076 3*

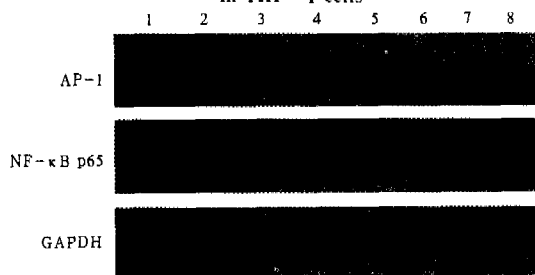
注:与对照组比较;\* $P<0.01$

**2.3 THP-1 细胞和创伤患者外周血白细胞中 NF- $\kappa$ B p65 和 AP-1 蛋白表达(图 3,图 4,表 2):**DEX 刺激组 NF- $\kappa$ B p65 和 AP-1 蛋白在 THP-1 细胞和创伤患者外周血白细胞中表达水平均低于对照组,差异均有显著性( $P$  均  $<0.01$ )。



1,2 为对照组;3,4 为 DEX 刺激组;GAPDH 为内参照物  
**图 3 AP-1 和 NF- $\kappa$ B p65 在 THP-1 细胞中的蛋白表达**

**Figure 3 Expressions of AP-1 protein and NF- $\kappa$ B p65 in THP-1 cells**



1~4 为对照组;5~8 为 DEX 刺激组;GAPDH 为内参照物  
**图 4 AP-1 和 NF- $\kappa$ B p65 在创伤患者外周血白细胞中的蛋白表达**

**Figure 4 Expressions of AP-1 protein and NF- $\kappa$ B p65 of leukocytes in peripheral blood of trauma patients**

**表 2 Western blotting 分析 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 蛋白表达( $\bar{x}\pm s$ )**

**Table 2 Expressions of NF- $\kappa$ B and AP-1 protein detected by Western blotting( $\bar{x}\pm s$ )**

组别	THP-1 细胞		创伤患者外周血白细胞	
	NF- $\kappa$ B/GAPDH	AP-1/GAPDH	NF- $\kappa$ B/GAPDH	AP-1/GAPDH
对照组	1.170 4±0.062 9	0.676 4±0.088 3	0.187 5±0.006 1	0.114 3±0.016 7
刺激组	0.283 9±0.034 2*	0.131 8±0.043 5*	0.102 9±0.005 7*	0.030 1±0.012 4*

注:与对照组比较;\* $P<0.01$

## 3 讨论

严重创伤可致中性粒细胞、单核/巨噬细胞激活并分泌大量炎症介质,并在创伤后 SIRS 及 MODS 的发生发展过程中起极为重要的角色<sup>[8,9]</sup>。SIRS 的发生、失控与机体促炎-抗炎因素失衡,机体稳态被破坏,导致内环境紊乱有关<sup>[10-12]</sup>。

人类 GILZ 基因 cDNA 全长 1 946 bp,基因定位于染色体的 Xq22.2 区域。GILZ 存在于人体的心、脑、肺、肾、脾、骨骼肌、骨髓细胞、单核细胞、粒细胞、淋巴结、成熟 B 细胞和 T 细胞中<sup>[13]</sup>。GILZ 在糖皮质激素(glucocorticoid,GC)的刺激下,不仅在淋巴细胞中表达增强,在单核细胞和巨噬细胞中表达也明显增强<sup>[14]</sup>。研究显示,GILZ 高表达时,可明显抑制 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 的活性。GILZ 通过一种蛋

白间的相互影响来干预 NF- $\kappa$ B p65 和 p52 亚单位,而 p65 是 NF- $\kappa$ B 发挥主要功能的亚单位<sup>[3]</sup>。同时, GILZ 通过对 c-Fos 和 c-Jun 蛋白的作用,抑制 AP-1 与其靶 DNA 结合,从而抑制 AP-1 活性<sup>[15]</sup>。NF- $\kappa$ B 广泛存在于机体各种细胞的胞浆中,是许多促炎细胞因子、炎症介质、黏附分子和急性期反应蛋白高表达所必需的转录因子,并通过调控细胞因子级联作用和其他促炎介质产生而在急性炎症反应中起枢纽作用<sup>[16,17]</sup>。AP-1 也参与了多种炎症介质的表达调控,包括 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、巨噬细胞炎症蛋白-1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ )、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)和诱生型一氧化氮合酶(iNOS)等,它们在炎症反应中可能起重要作用。而 GILZ 可抑制 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 活化,从而降低炎症介质的产生和释放,抑制中性粒细胞炎症反应,发挥其抗炎作用,减少组织损伤和器官功能紊乱。

本研究结果显示,刺激组 THP-1 细胞和创伤患者外周血白细胞中 GILZ mRNA 表达水平均明显高于对照组;NF- $\kappa$ B p65 和 AP-1 蛋白表达水平均低于对照组。说明在 GC 刺激下, GILZ 的高表达可抑制 NF- $\kappa$ B p65 和 AP-1 活性,从而减少促炎基因表达,阻断由于过度放大的炎症反应而引发 SIRS,具有抗炎反应作用。

#### 参考文献:

- D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, et al. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death[J]. *Immunity*, 1997, 7(6): 803-812.
- Riccardi C, Cifone M G, Migliorati G. Glucocorticoid hormone-induced modulation of gene expression and regulation of T cell death: role of GTR and GILZ, two dexamethasone induced genes[J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6(12): 1182-1189.
- Ayrolidi E, Migliorati G, Bruscoli S, et al. Modulation of T cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB[J]. *Blood*, 2001, 98(3): 743-753.
- Yang Y, Mercep M, Ware C F, et al. Fas and activation-induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas; inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids[J]. *J Exp Med*, 1995, 181(5): 1673-1682.
- Jain J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene[J]. *Curr Opin Immunol*, 1995, 7(3): 333-342.
- Ayrolidi E, Zollo O, Macchiarulo A, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(22): 7929-7941.
- McCormick S M, Eskin S G, McIntire L V, et al. DNA microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(16): 8955-8960.
- Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response[J]. *Intensive Care Med*, 2000, 26(Suppl 1): S64-74.
- 林洪远, 盛志勇. 全身炎症反应和 MODS 认识的变化及现状[J]. *中国危重病急救医学*, 2001, 13(11): 643-646.
- Bone R C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS[J]. *Crit Care Med*, 1996, 24(7): 1125-1128.
- Hart P H, Bonder C S, Balogh J, et al. Differential responses of human monocytes and macrophages to IL-4 and IL-13[J]. *J Leukoc Biol*, 1999, 66(4): 575-578.
- 蔺宏伟, 岳茂兴. 多器官功能障碍综合征与免疫失衡[J]. *中国危重病急救医学*, 2001, 13(9): 565-567.
- Cannarile L, Zollo O, D'Adamio F, et al. Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene[J]. *Cell Death Differ*, 2001, 8(2): 201-203.
- Berrebi D, Bruscoli S, Cohen N, et al. Synthesis of glucocorticoid induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10[J]. *Blood*, 2003, 101(2): 729-738.
- Mittelstadt P R, Ashwell J D. Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(31): 29603-29610.
- Christman J W, Lancaster L H, Blackwell T S. Nuclear factor kappa B, a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy[J]. *Intensive Care Med*, 1998, 24(11): 1131-1138.
- 林季, 颜光涛. 急性炎症反应中真核细胞转录因子- $\kappa$ B 的信号传导作用[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(1): 45-48.

(收稿日期: 2006-07-04 修回日期: 2006-10-29)

(本文编辑: 李银平)

## • 科研新闻速递 •

### 脓毒症患者氨基脑促尿钠排泄肽水平与前降钙素原和 C-反应蛋白水平有关

为了探讨脓毒症患者氨基脑促尿钠排泄肽(NT-proBNP)、前降钙素原(PCT)、C-反应蛋白(CRP)水平三者之间的相互关系,最近波兰学者对罗兹一家医院的 20 位患有脓毒症或严重脓毒症的患者进行了一项前瞻性研究。128 次测试结果显示, NT-proBNP、PCT 和 CRP 的平均浓度分别为(140.80 $\pm$ 84.65)ng/L、(22.32 $\pm$ 97.41) $\mu$ g/L 和(128.51 $\pm$ 79.05)mg/L。NT-proBNP 与 PCT 及与 CRP 之间的相关系数分别为 0.327 3( $P$ <0.001)和 0.413 4( $P$ <0.001)。这说明脓毒症患者 NT-proBNP 与 PCT、CRP 水平均显著相关,而且存活组的 NT-proBNP 浓度明显低于死亡组。

于燕, 编译自《Cell Mol Biol Lett》, 2006-12-05(电子版); 胡森, 审校