

网络出版时间:2016-4-19 11:04:48 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160419.1104.018.html>

Kv1.3 在 LPS 诱导的小鼠急性肝损伤模型中表达变化

周群^{1,2,3}, 吴宝明^{1,2,3}, 孟晓明^{1,2,3}, 黄成^{1,2,3}, 李俊^{1,2,3}

摘要 目的 探讨脂多糖(LPS)诱导的小鼠急性肝损伤模型中钾离子通道蛋白 Kv1.3 的表达水平。方法 选取 C57BL/6 小鼠,建立 LPS 诱导的急性肝损伤模型,采用组织病理学检查,观察肝损伤病变,相关试剂盒检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)水平,免疫组化、荧光实时定量反转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)及 Western blot 检测 Kv1.3 表达变化;选取原位灌注的方法分离原代肝脏枯否细胞(KCs),检测 Kv1.3 的表达变化。体外培养 RAW264.7 细胞,使用 LPS 刺激,进一步检测 Kv1.3 的表达变化;使用 Kv1.3 特异性阻断剂玛格毒素(MgTx)预处理 RAW264.7 细胞,再加 LPS 刺激,采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测细胞因子的表达变化。**结果** 组织病理学检查证实急性肝损伤模型建立成功,模型组的 ALT 和 AST 含量均高于正常组($P < 0.01$),模型组组织和原代肝脏 KCs 中 Kv1.3 表达均低于正常组($P < 0.01$),体外实验 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后,Kv1.3 表达降低($P < 0.05$);Kv1.3 特异性阻断剂 MgTx 减少 LPS 诱导的细胞因子的分泌。**结论** Kv1.3 在急性肝损伤模型中的表达降低,阻断 Kv1.3 能减少 LPS 诱导巨噬细胞炎症因子的分泌,Kv1.3 可能在治疗肝脏疾病过程中发挥着重要的作用。

关键词 离子通道;急性肝损伤;细胞因子;枯否细胞;T 淋巴细胞

中图分类号 R 967;R 965.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)05-0649-07

急性肝损伤是多种病因(病毒、化学药品、乙醇、免疫反应等)引起的急性肝脏损害的一种疾病,也可继发于某些全身性疾病,其发病率较高,目前尚

无特效的防治方法。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的免疫性急性肝损伤模型,是目前常用的研究肝脏损伤机制模型。在免疫性肝损伤中,免疫细胞如巨噬细胞、T 淋巴细胞在机体的发病过程中起着重要作用。钾离子通道蛋白 Kv1.3 在 T 淋巴细胞、巨噬细胞活化过程中发挥重要作用,参与多种疾病的发生和发展。该研究通过建立 LPS 诱导的急性肝损伤模型,观察急性肝损伤模型 Kv1.3 的表达变化,体外采用 LPS 刺激小鼠巨噬细胞 RAW264.7,检测 Kv1.3 的表达变化,同时采用特异性阻断剂阻断 Kv1.3,检测对 LPS 诱导的炎症细胞因子分泌的影响,探讨 Kv1.3 通道在免疫性急性肝损伤进程中的潜在作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 40 只健康雄性 C57BL/6 小鼠,18~22 g,购于安徽医科大学实验动物中心。饲养于安徽医科大学药学院动物房。

1.2 细胞株和细胞培养 小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 购自美国 ATCC 细胞库。用 DMEM 高糖混合培养基(含 10% FBS 及 100 U/ml 青霉素、100 g/ml 链霉素)于 37 °C 5% CO₂ 环境中培养,细胞为贴壁生长,当细胞生长融合达到 80% 时,用 0.25% 胰酶消化液消化传代或按浓度接种培养瓶培养板,实验细胞均处于对数生长期。

1.3 主要药品与试剂 LPS 购自美国 Sigma 公司;丙氨酸氨基转移酶(amine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartateaminotransferase, AST)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;RIPA 裂解液(强)、非变性 PAGE 蛋白上样缓冲液(5X)、HRP-羊抗兔 IgG、HRP-羊抗小鼠 IgG、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所;ECL 发光试剂盒购自美国 Thermo 公司;肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor α, TNF-α)、Kv1.3、诱生型一氧化氮合

2016-02-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81273526、81473268、81500473);安徽省科技攻关计划项目(编号:1301042212);安徽省自然科学基金(编号:1308085MH145)

作者单位:安徽医科大学¹药学院,²肝病研究所,³安徽省创新药物产业共性研究院,合肥 230032

作者简介:周群,男,硕士研究生;

李俊,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:lj@ahmu.edu.cn

Conclusion CP-25 play important roles in immune regulation in AA rats through reducing the expression of BAF-FR and TRAF2 in spleen.

Key words rheumatoid arthritis; adjuvant-induced arthritis; CP-25; BAFF; BAFFR; TRAF2

酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)一抗购自美国 Abcam 公司;白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、 β -actin、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)一抗购自武汉博士德生物工程有限公司;TRIzol Reagent RNA 提取试剂购自美国 Invitrogen 公司; β -actin、IL-6、Kv1.3、iNOS、IL-1 β 、TNF- α 引物由 Invitrogen(上海)公司合成;FBS 购自杭州四季青生物工程材料有限公司;DMEM 培养液购自美国 HyClone 公司;荧光定量染料 SYBR Green 购自德国 QIAGEN 公司。

1.4 方法

1.4.1 动物模型的建立与处理 C57BL/6 小鼠 40 只,随机分为正常组($n=20$)和急性肝损伤模型组($n=20$)。所有小鼠处理前禁食 12 h,参照文献^[1-2],模型组小鼠腹腔注射 10 mg/kg 的 LPS,正常组注射等体积的 0.9% NaCl 溶液。处理过 24 h 后,所有小鼠眼球采血,分离血清,测定 ALT、AST 活性。取部分肝左叶组织,用 10% 甲醛溶液固定,剩余肝组织放入液氮速冻,然后转入 -80 °C 冰箱进行长期保存。

1.4.2 KCs 提取 参考实验室提取 KCs 方法^[3],提取正常组、模型组 KCs,进行后续实验。

1.4.3 LPS 刺激 RAW264.7 建立炎症模型 用 1 000 ng/ml LPS 溶液刺激 RAW264.7 细胞 24 h,建立炎症模型。Kv1.3 特异性阻断剂玛格毒素(MgTx, 10 nmol/L)于 LPS 处理前 2 h 加入。

1.5 检测指标和方法

1.5.1 肝组织形态学 HE 染色 取 10% 甲醛溶液固定的肝左叶组织,常规石蜡包埋,切片后脱蜡于苏木精和伊红染料中依次染色,封片后于光学显微镜下观察肝组织形态学的变化。

1.5.2 ALT、AST 活性检测 小鼠眼球采血,4 °C 静置过夜后,2 000 r/min 离心 10 min,吸取上层血清,根据试剂盒说明书,检测血清血清 ALT、AST 活性。

1.5.3 免疫组化方法检测 Kv1.3 蛋白表达 小鼠肝组织经甲醛溶液固定及石蜡包埋后制成 2 μ m 厚度的切片,并经多聚赖氨酸处理,将石蜡切片常规脱蜡,滴加 3% 过氧化氢溶液以抑制内源性过氧化物酶,放置于室温下孵育 15 min。冲洗甩干后浸泡于柠檬酸盐缓冲液中,并使用微波炉高火加热 10~15 min,以修复表面抗原,PBS 冲洗后加入山羊血清封闭,37 °C 孵育 30 min,再滴加山羊抗大鼠 Kv1.3 多克隆抗体(1:500),使用 PBS 作为阴性对照组,后放置于 4 °C 冰箱中过夜,第 2 天,将切片放入 37 °C 温箱中孵育 30 min 复温,PBS 冲洗甩干后滴加聚合

物增强剂,37 °C 孵育 20 min,PBS 冲洗后加入辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 多聚体,30 °C 孵育 30 min,PBS 冲洗甩干后应用 DAB 显色。

1.5.4 实时定量 RT-PCR 检测 Kv1.3 及细胞因子的表达应用 TRIzol 试剂盒提取肝组织、原代提取 KCs、细胞株 RAW264.7 中总 RNA,并测定其浓度和纯度,并要求吸光度(absorbance, A)值 A260/A280 为 1.8~2.0,并调整 RNA 浓度至 1 mg/L,采用一步法 RT-PCR 试剂盒反转录 cDNA。

表 1 基因引物序列

目标基因	引物序列(5'→3')
Kv1.3	F: CAGTGACCATAGGAGGCAAGATT
	R: TCTGCTGAAGAGGAGAGGTGCT
IL-6	F: GAGGATACCACTCCCAACAGACC
	R: AAGTGCATCATCGTTGTCATACA
TNF- α	F: TGTCCCTTTCACCTCACTGGC
	R: CATCITTTGGGGGAGTGCCT
IL-1 β	F: CITTGAAGTTACCGGACCC
	R: TGAGTGATACTGCCTGCCTG
iNOS	F: AATCTTGGACCGAGTTGTGC
	R: CAGGAAGTAGGTGAGGGCTTG
GAPDH	F: GCACCTCATCGCTACAT
	R: TAGGGCTCTCTTCGCTCAGT

1.5.5 Western blot 检测 Kv1.3 及细胞因子蛋白表达 使用 RIPA 裂解液提取肝组织、原代 KCs 和 RAW264.7 细胞,裂解充分后,用移液管将匀浆液转移至 1.5 ml EP 管中,4 °C、12 000 r/min 离心 30 min,取上清液;使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量检测,各组上清液用裂解液调至相同蛋白浓度,加入 5 \times SDS 蛋白上样缓冲液,100 °C 沸水煮 10 min,进行 SDS-PAGE 电泳并转膜于 PVDF 膜上,PVDF 膜用含 5% 脱脂牛奶室温置于水平摇床封闭 3 h。然后依次滴加 1:500 的鼠抗 Kv1.3、兔抗 TNF- α 、抗 IL-6 和 β -actin 抗体,4 °C 孵育过夜后 TBST 洗涤 3 次,每次 15 min,使用 1:10 000 山羊抗鼠/兔二抗孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 15 min。最后用 ECL 发光液进行曝光显影,Bio-Rad 照相系统拍照,并用 Image-J 软件分析蛋白的相对表达量。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 LSD-t 检验,多组均数比较采用 One-Way ANOVA 法。

2 结果

2.1 鼠肝组织及血清相关检测结果

2.1.1 两组小鼠的肝组织病理学检查比较 光镜下观察,正常组肝脏组织形态正常,肝小叶结构清楚;模型组可见大量肝细胞坏死,肝小叶结构模糊,组织汇管区充血,周边出现炎性细胞浸润及大小不等的空泡样变,肝细胞混浊肿胀、边界不清、胞质疏松淡染。见图1。

2.1.2 两组小鼠血清 ALT、AST 活性结果 检测血清中酶的活性的改变可以反映肝脏的功能情况,当肝细胞受损时,肝细胞内的 ALT、AST 释放入血,血清 ALT、AST 活性会升高。因此,这两种酶的活性升高成为肝功能受损的特异性指标。结果显示,模型组小鼠血清 ALT、AST 活性显著升高,与正常组相比,差异有统计学意义($t=8.020, 5.033, P<0.01$)。见图2。

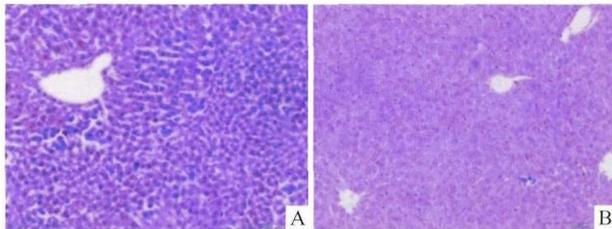


图1 鼠肝脏组织形态学染色 HE×200
A:正常组;B:模型组

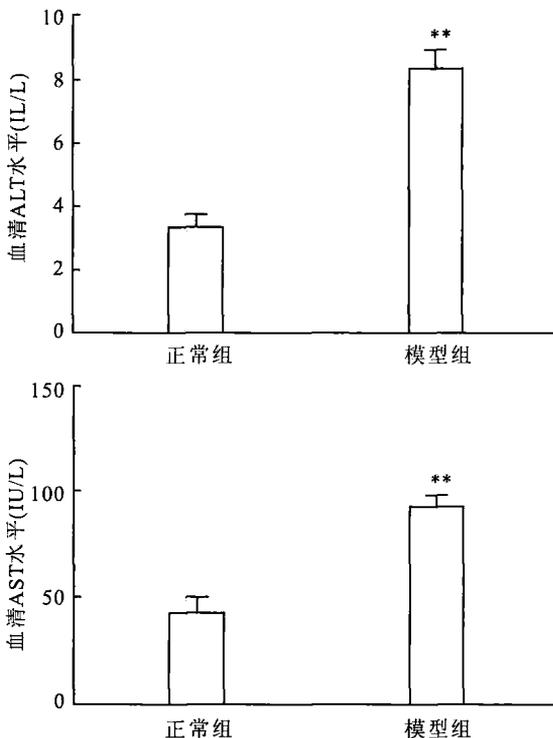


图2 正常组与模型组 ALT、AST 结果
与正常组比较: ** $P<0.01$

2.1.3 免疫组化法检测肝组织 Kv1.3 蛋白表达情况 免疫组化结果显示,与正常组相比,模型组肝组织 Kv1.3 蛋白表达明显减少,见图3。

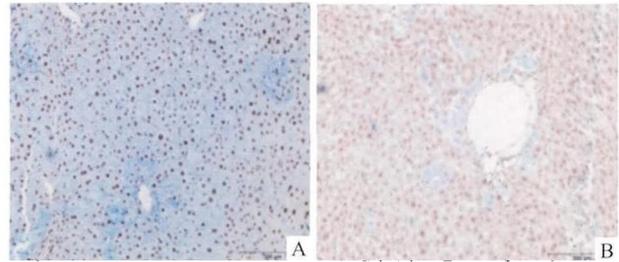


图3 免疫组化法标记肝组织 Kv1.3 的表达 SP×200
A:正常组;B:模型组

2.1.4 实时荧光定量 RT-PCR 的相对定量结果 采用 qRT-PCR 检测正常组和模型组肝组织中 Kv1.3 及各细胞因子 mRNA 表达水平,结果显示,模型组肝组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 水平显著升高($t=10.03, 9.811, 14.88, P<0.01$), Kv1.3 mRNA 水平降低($t=3.353, P<0.05$)。见图4。

2.1.5 两组间 Kv1.3、TNF- α 、IL-6 蛋白表达量的比较 Western blot 结果显示,与正常组相比,模型组肝组织细胞因子 TNF- α ($t=9.532, P<0.01$)、IL-6 ($t=3.663, P<0.05$) 蛋白表达水平升高, Kv1.3 蛋白表达水平显著降低($t=5.941, P<0.01$)。见图5。

2.2 原代 KCs 中 Kv1.3、TNF- α mRNA 的表达 qRT-PCR 结果显示,模型组提取的 KCs 中 TNF- α mRNA 表达显著高于正常组($t=4.886, P<0.01$)。模型组 Kv1.3 mRNA 表达显著低于正常组($t=14.35, P<0.01$)。见图6。

2.3 体外 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 Kv1.3 的表达 模型组为采用 1 000 ng/ml LPS 刺激 RAW264.7 细胞 24 h, qRT-PCR 结果显示,与正常组相比,模型组 Kv1.3 mRNA 的表达降低,与正常组相比,差异有统计学意义($t=4.583, P<0.05$)。见图7。

2.4 MgTx 抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞因子的分泌

2.4.1 实时荧光定量 RT-PCR 的相对定量结果 qRT-PCR 结果显示, MgTx 预处理后, LPS 诱导的细胞因子 iNOS、IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平降低,与模型组比较,差异有统计学意义($F=168.2, 862.9, 596.7, 61.11, P<0.05, P<0.01$)。见图8。

2.4.2 MgTx 抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞因

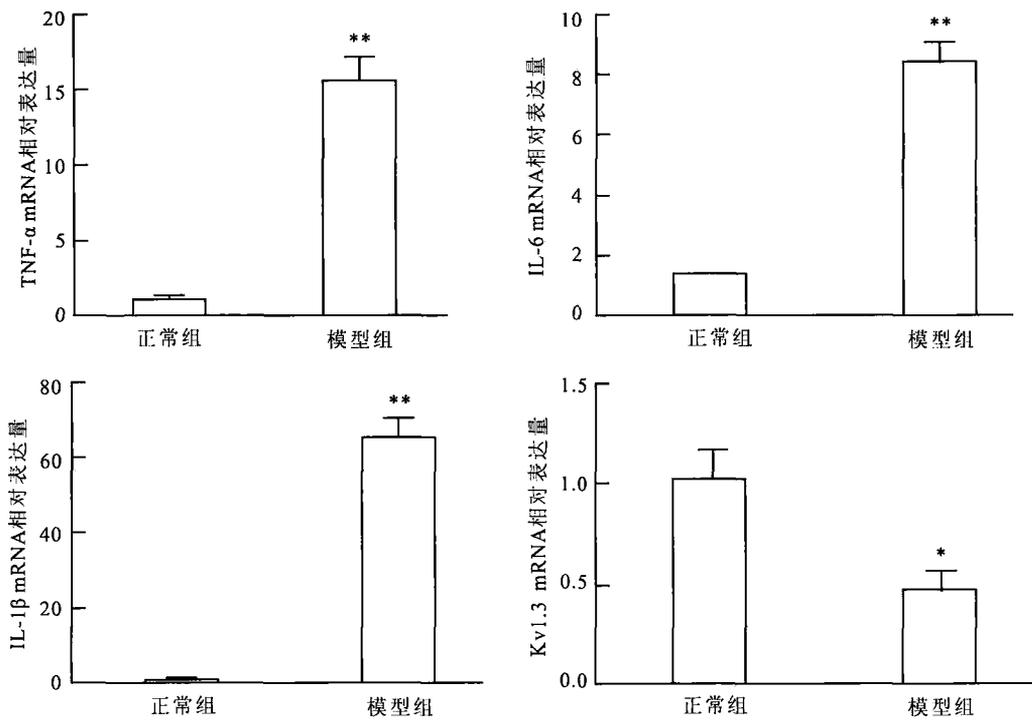


图4 肝组织各细胞因子及 Kv1.3 mRNA 表达水平
与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

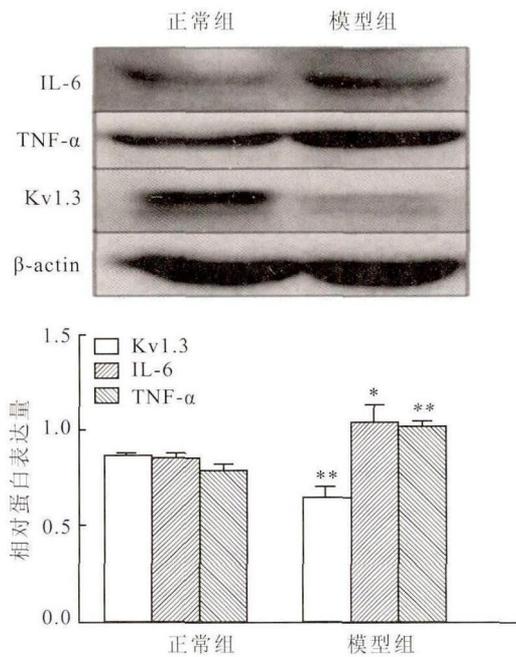


图5 肝组织各细胞因子及 Kv1.3 蛋白表达
与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

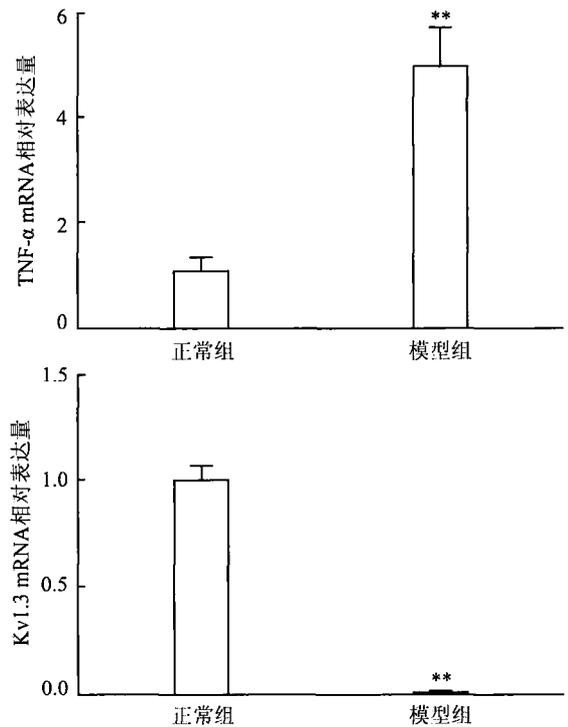


图6 原代 KCs 中 Kv1.3、TNF-α mRNA 表达水平
与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

子分泌的蛋白 Western blot 结果显示, MgTx 预处理后, LPS 诱导的细胞因子分泌与 LPS 模型组相比, iNOS、IL-6、IL-1β、TNF-α 蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 ($F = 377.3, 109.5, 115.0, 20.44, P < 0.05, P < 0.01$)。见图 9。

3 讨论

急性肝损伤是易发和常见的肝脏疾病, 而内毒素血症是引起肝损伤的主要病因, 因此内毒素诱发

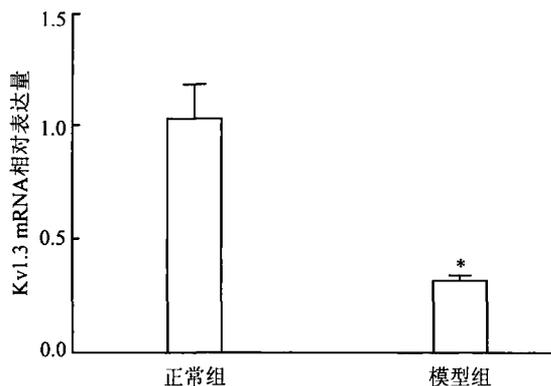


图7 Kv1.3 mRNA 表达水平
与正常组比较: * $P < 0.05$

急性肝损伤模型的建立对基础科研和临床用药研究有重要意义。啮齿类动物腹腔内单独应用 LPS 或与肝毒素共同作用建立肝脏急性炎症损伤模型,已被广泛应用^[4]。本实验采用腹腔注射 10 mg/kg LPS 作用 24 h 后,收集血清和肝脏组织。组织病理学 HE 染色验证模型建造成功,血清 ALT/AST 活性的测定反映了肝细胞损害和坏死的程度。

文献^[5]报道,CD4⁺ T 淋巴细胞及其分泌的细胞因子如 TNF- α 、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 有促肝脏损伤作用,同时在自身免疫性肝脏疾病中,T 淋巴细胞介导的免疫炎症显著促进此类肝脏疾病中肝脏损伤的发生和进展^[6]。在参与炎性反应的细胞中,T 淋巴细胞活化为 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞,通过分

泌 IL-1 β 、IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子,进一步激活肝脏 KCs,在这些细胞因子及相关黏附分子的介导下引起免疫炎症反应导致肝细胞及组织损伤^[7]。KCs 是肝内定居的巨噬细胞,在炎症和防御的过程中起重要作用。LPS 可通过受体激活 NF- κ B,使肝脏 KCs 释放内源性致炎细胞因子,在免疫性肝损伤中发挥着重要作用。

细胞膜上离子通道电生理活性,对于细胞的活化、细胞因子的分泌、细胞的增殖等起着重要作用。正常大鼠腹腔巨噬细胞钾离子通道电生理特性证实了巨噬细胞表达不同的功能性钾离子通道蛋白亚型^[8]。文献^[9-10]报道,Kv1.3 对巨噬细胞生理功能调节起着重要作用,影响细胞增殖和细胞因子分泌。Kv1.3 通道属于电压门控钾通道 Shaker 家族,是由约 500 个氨基酸的亚单位非共价结合形成的同源四聚体,是巨噬细胞主要表达的钾离子通道亚型。Kv1.3 在动脉粥样硬化^[11]、胰腺癌^[12]、乳腺癌^[13] 等疾病中异常表达,已成为疾病治疗的重要靶点。

鉴于 Kv1.3 在巨噬细胞及许多疾病中都起着重要作用,而 Kv1.3 在肝脏损伤方面暂无研究,为此本课题组设计探讨 Kv1.3 在免疫性肝损伤中的作用。结果显示,Kv1.3 在 LPS 诱导的小鼠急性肝损伤模型中表达降低,提示 Kv1.3 的异常表达可能参与急性肝损伤的发生发展过程。体外实验证实 Kv1.3 特异性阻断剂 MgTx 能减少 LPS 诱导的

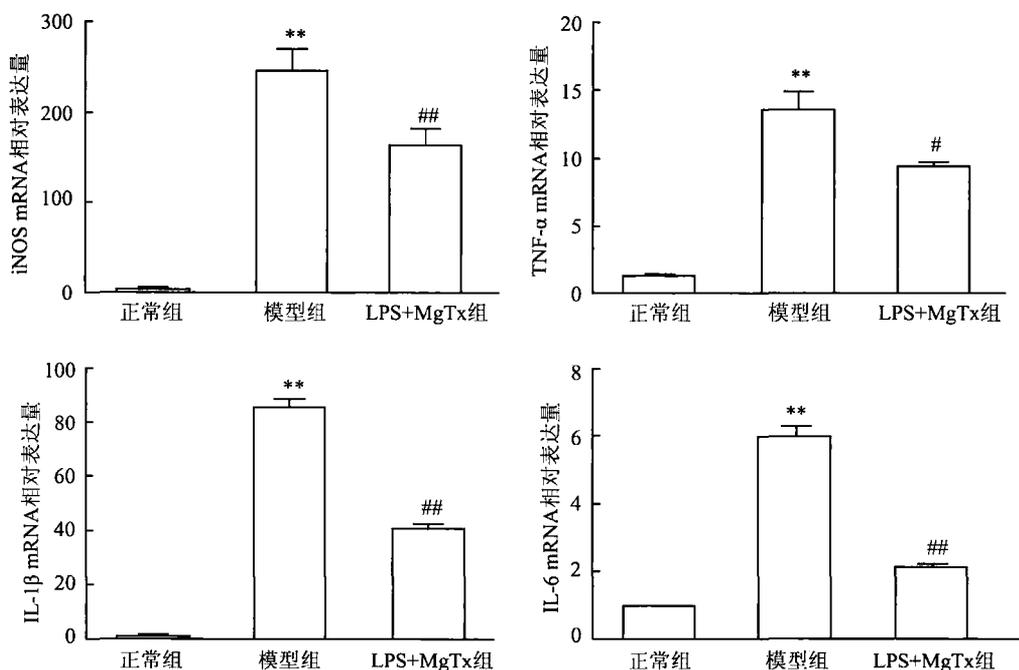


图8 MgTx 抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞因子分泌的 mRNA 表达
与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

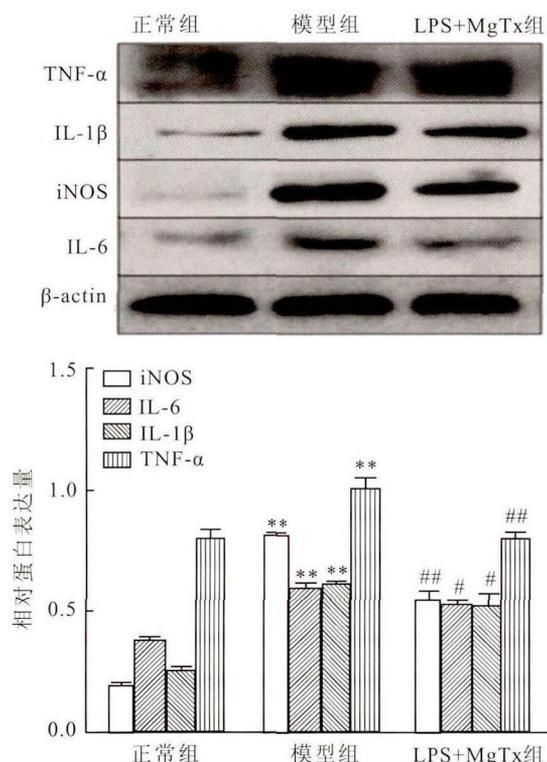


图9 MgTx抑制LPS诱导的RAW264.7细胞因子分泌蛋白表达与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

RAW264.7细胞因子TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的释放,同时发现,MgTx能减少iNOS生成,抑制NO释放减少^[14]。进一步提示Kv1.3参与急性肝损伤过程,可能与调节KCs细胞因子的分泌有关。在肝损伤过程中,TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等细胞因子可造成炎性细胞浸润及肝细胞损伤坏死,最终导致肝脏病变,阻断Kv1.3能减少KCs细胞因子分泌,表明Kv1.3在急性肝损伤过程中发挥着重要作用。

鉴于Kv1.3在肝脏KCs活化过程中所扮演的角色,而KCs正是免疫性急性肝损伤重要的免疫细胞,Kv1.3将有可能成为免疫性肝损伤防治的重要靶点。

参考文献

[1] 李炫飞,范霞,郑志华,等. 胍丁胺对脂多糖诱导急性肝损伤

的保护作用[J]. 中华危重病急救医学,2013,25(12):720-4.

[2] 刘韦成,罗学来,李兆明,等. 脂多糖诱导小鼠肝损伤模型及致死模型的建立[J]. 中华实验外科杂志,2012,29(2):330-2.

[3] 程希,胡超杰,李晚霞,等. 酒精性脂肪肝中库普弗细胞表型变化的探讨[J]. 安徽医科大学学报,2015,50(2):149-53.

[4] Hamesch K, Borkham-Kamphorst E, Strnad P, et al. Lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in mice [J]. Lab Anim, 2015,49(1 Suppl):37-46.

[5] Tsutsumi H, Nishiguchi S. Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice [J]. Int J Mol Sci, 2014,15(5):7711-30.

[6] Toldi G, Munoz L, Herrmann M, et al. The effects of Kv1.3 and IKCa1 channel inhibition on cytokine production and calcium influx of T lymphocytes in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis [J]. Immunol Res, 2015,8(18):1527-3350.

[7] Wang H X, Liu M, Weng S Y, et al. Immune mechanisms of concanavalin A model of autoimmune hepatitis [J]. World J Gastroenterol, 2012,18(2):119-25.

[8] Wu B M, Wang X H, Zhao B, et al. Electrophysiology properties of voltage-gated potassium channels in rat peritoneal macrophages [J]. Int J Clin Exp Med, 2013,6(3):166-73.

[9] Villalonga N, Escalada A, Vicente R, et al. Kv1.3/Kv1.5 heteromeric channels compromise pharmacological responses in macrophages [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007,352(4):913-8.

[10] Villalonga N, David M, Bielanska J, et al. Immunomodulation of voltage-dependent K⁺ channels in macrophages: molecular and biophysical consequences [J]. J Gen Physiol, 2010,135(2):135-47.

[11] 王焱,李桂阳,李枚娟,等. Kv1.3在动脉粥样硬化大鼠主动脉的表达变化[J]. Shanghai Med J, 2011,34(3):186-9.

[12] Brevet M, Fucks D, Chatelain D, et al. Deregulation of 2 potassium channels in pancreas adenocarcinomas [J]. Pancreas, 2009,38(6):649-54.

[13] Brevet M, Haren N, Sevestre H, et al. DNA methylation of Kv1.3 potassium channel gene promoter is associated with poorly differentiated breast adenocarcinoma [J]. Cell Physiol Biochem, 2009,24(1-2):25-32.

[14] Zhu H, Yan L, Gu J, et al. Kv1.3 channel blockade enhances the phagocytic function of RAW264.7 macrophages [J]. Sci China Life Sci, 2015,58(9):867-75.

Expression profile of voltage-gated potassium channel Kv1.3 in LPS-induced acute liver injury

Zhou Qun^{1,2,3}, Wu Baoming^{1,2,3}, Meng Xiaoming^{1,2,3}, et al

(¹School of Pharmacy, Anhui Medical University, ²Institute for Liver Diseases of Anhui Medical University, ³Anhui Institute of Innovative Drugs, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression profile of voltage-gated potassium channel Kv1.3 in lipopo-

网络出版时间:2016-4-19 11:04:48 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160419.1104.020.html

Gas-6 蛋白对小鼠急性肺损伤保护作用的研究

尹璐,杨进,汪影,毕继蕊,刘辉,陆友金

摘要 目的 研究外源性 Gas-6 蛋白对脂多糖(LPS)诱发小鼠急性肺损伤的保护作用。方法 将 Balb/c 小鼠随机分为空白对照组、Gas-6 蛋白对照组、LPS 处理组、Gas-6 蛋白保护组。LPS 处理组、Gas-6 蛋白保护组分别通过腹腔注射 LPS 诱导急性肺损伤模型,其余组以等量生理盐水作为对照。而后 Gas-6 蛋白对照组及 Gas-6 蛋白保护组立刻通过尾静脉注入 Gas-6 蛋白,其余两组以等量生理盐水作为对照。LPS/生理盐水注射 12 h 后,取小鼠血清及肺组织。HE 染色观察小鼠肺组织病理学改变,测定肺组织病理学评分、肺组织湿/干质量比、检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白介素-6 (IL-6)水平以及肺组织中 TNF- α mRNA、IL-6 mRNA 的表达情况。结果 肺组织病理学检查显示:与空白对照组比较,LPS 处理组小鼠肺水肿、肺组织充血、中性粒细胞浸润、炎性渗出较明显,而 Gas-6 蛋白可减轻上述改变。LPS 处理组小

鼠肺组织湿/干质量比、肺组织病理学评分、血清中 TNF- α 、IL-6 水平及肺组织中 TNF- α mRNA、IL-6 mRNA 的表达较空白对照组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而 Gas-6 蛋白保护组上述指标较 LPS 处理组均有所下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 Gas-6 蛋白对 LPS 所诱导的急性肺损伤小鼠有保护作用。

关键词 Gas-6 蛋白;脂多糖;急性肺损伤

中图分类号 R 563.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)05-0655-05

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是因各种损伤因素导致毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤,进而造成弥漫性肺水肿,其发病的关键步骤是过度的炎症反应。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性细菌细胞壁的关键成分,参与启动机体炎症反应,可导致 ALI^[1]。Gas-6 蛋白属于维生素 K 依赖的蛋白家族。研究^[2]表明 Gas-6 蛋白可作用于 Tyro-3、Mer、Axl(简称 TAM)3 个不同的受体酪氨酸激酶,抑制炎症反应。Giangola et al^[3]有关小鼠肾脏缺血/再灌注模型的研究表明, Gas-6 蛋白能明显

2016-02-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81400058);安徽高校省级自然科学基金研究项目(编号:KJ2013Z154)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院呼吸内科,合肥 230601

作者简介:尹璐,女,硕士研究生;

陆友金,男,硕士生导师,责任作者, Email: luyougolden@hotmail.com

lysaccharide(LPS)-induced acute liver injury. **Methods** C57BL/6 mice were injected with LPS intraperitoneally for 24 h, to establish the model of acute liver injury. The morphological changes of liver tissues were observed by HE staining. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were measured using test kits. The Kv1.3 expression was measured by immunohistochemistry, Florescent real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and Western blot. Kupffer cells (KCs) were isolated by in situ perfusion, and then applied to detect Kv1.3, tumor necrosis factor alpha(TNF- α) expression by qRT-PCR. The expression of Kv1.3 was also detected in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Margatoxin (MgTx) was pretreated to block Kv1.3 in LPS-stimulated RAW264.7 cells, then detected the expression of cytokines by qRT-PCR and Western blot. **Results** HE staining showed that liver tissues were damaged by LPS, ALT and AST levels increased significantly after LPS treatment ($P < 0.01$). The Kv1.3 expression decreased significantly in model group compared to normal group ($P < 0.01$). Kv1.3 was low expressed in KCs in LPS-induced acute liver injury model group ($P < 0.01$). LPS-stimulated RAW264.7 cells expressed low level of Kv1.3 ($P < 0.05$), and MgTx, the Kv1.3 specific blocker, decreased LPS-induced cytokinesis secretion. **Conclusion** The results indicate that Kv1.3 is low expressed in LPS-induced acute liver injury and blocking of the Kv1.3 channel decreases LPS-induced cytokinesis secretion in macrophage. Kv1.3 may play an important role in the treatment of liver diseases.

Key words ion channel; acute liver injury; cytokinesis; Kupffer cells; T lymphocyte