

网络出版时间: 2016-10-12 13:23:00 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161012.1323.007.html>

Tim 3 对 poly(I : C) 介导的小鼠 Kupffer 细胞分泌细胞因子的影响

牛 坚, 王 月, 王入颢, 刘 斌

摘要 目的 探讨 T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白家族-3(Tim 3) 对 poly(I : C) 活化的小鼠肝 Kupffer 细胞调节作用并探讨其相关机制。方法 将真核表达质粒 pcDNA3.1-Tim 3 转染小鼠肝 Kupffer 细胞, 以 Realtime PCR 和 Western blot 法验证 Tim 3 在小鼠肝 Kupffer 细胞的表达。通过 ELISA 法检测质粒 pcDNA3.1-Tim 3 并使用 Tim 3 阻断型抗体和核转录因子 kappa B(NF- κ B) 抑制性配体对 poly(I : C) 活化的小鼠肝 Kupffer 细胞因子[肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)]产生影响, Western blot 法检测 NF- κ B p65、I κ B α 蛋白表达。结果 Tim 3 抑制小鼠肝 Kupffer 细胞分泌炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β , Western blot 结果显示其降低小鼠肝 Kupffer 细胞 NF- κ B p65 蛋白和提高 I κ B α 蛋白表达。结论 Tim 3 通过 NF- κ B 通路参与了 poly(I : C) 诱导小鼠肝 Kupffer 细胞活化的调节。

关键词 Tim 3; Kupffer 细胞; 小鼠

中图分类号 R 392

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)11-1584-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.007

聚肌胞苷酸(poly I : C) 是一种双链 RNA 病毒模拟物, 能与 Toll 样受体 3(Toll-like receptor, TLR3) 结合, 后者主要表达在巨噬细胞和树突状细胞上。位于肝脏的巨噬细胞又称 Kupffer 细胞, 研究^[1-2]表明, poly I : C 能诱导肝 Kupffer 细胞的过度活化, 产生很多种炎症因子。最近实验显示 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3(T cells immunoglobulin and mucin family-3, Tim 3) 是炎症反应的一种重要调节分子, 提供抑制性信号, 对 Kupffer 细胞活化有重要的调控作用^[3]。该研究首先通过将表达 Tim 3 的质粒转染入小鼠 Kupffer 细胞, 检测其产生炎症因子的变化, 进一步研究产生这些改变的机制。

2016-06-15 接收

基金项目: 天晴肝病研究基金(编号: CFHPC20132020); 江苏省 333 高层次人才培养(编号: III-2290); 徐州市推动科技创新专项资金项目(编号: KC14SX011)

作者单位: 徐州医学院附属医院普外科 徐州 221002

作者简介: 牛 坚, 男, 副教授, 副主任医师, 责任作者, E-mail: njn_001@163.com

1 材料与方法

1.1 实验动物及实验材料 6~8 周龄 SPF 级健康 Balb/C 小鼠 22~24 g, 购自中国科学院上海实验动物中心。真核表达载体 pcDNA3.1-Tim 3 由 Sanchez-Fueyo A 教授赠送。兔抗鼠 Tim 3 抗体以及同型对照抗体、核转录因子 kappa B(nuclear factor of kappa B, NF- κ B) p65 单抗、NF- κ B 抑制蛋白 α (NF- κ B inhibitor alpha, I κ B α) 单抗购自美国 Santa Cruze 公司; Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司; poly(I : C)、NF- κ B 抑制剂 PDTC 购自美国 Sigma 公司; 小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-6(interleukin-6, IL-6) ELISA 检测试剂盒购自美国 eBioscience 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 Kupffer 细胞分离、培养 参照文献^[4]方法对小鼠肝脏 Kupffer 细胞进行分离、纯化。培养液 RPMI 1640 中含 10% 小牛血清, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 检测 poly(I : C) 介导的小鼠肝脏 Kupffer 细胞 Tim 3 的表达 小鼠肝脏 Kupffer 细胞调整浓度至 1×10^5 /ml, 接种于 24 孔培养板中, 37℃、5% CO₂ 培养过夜; 加入终浓度为 0、10、20、50 ng/ml poly(I : C) 继续培养 24 h, 收集细胞用于 Realtime PCR 法检测 Tim 3 的表达。Tim 3 上游引物: 5'-TTGACCCTGGCACTTATC-3', 下游引物: 5'-ATGGAGCATTTCATGTAGCAT-3'; GAPDH 上游引物: 5'-ACTTTGGCATTGTGGAAGG-3', 下游引物: 5'-GATGCAGGGATGATGTTCT-3'。具体操作步骤见参考文献^[5]。同时 Western blot 检测 Tim 3 蛋白的表达。

1.2.3 小鼠 Kupffer 细胞转染质粒 pcDNA3.1-Tim 3 后 Tim 3 的表达 将小鼠 Kupffer 细胞悬液接种于 24 孔板上, 接种密度为 1×10^5 个/孔, 放入 37℃、5% CO₂ 培养。转染前更换成不含血清的 RPMI-

1640, 采用 Lipofectamine™ 2000 脂质体转染试剂, 按使用说明书进行转染实验。转染质粒后的细胞孵育 6 h 换成正常培养液 24 h, 收集细胞。Realtime PCR 法检测 Tim 3 在 mRNA 水平的变化, 具体步骤如参考文献^[5]。Western blot 法检测 Tim 3 在蛋白水平的变化, 一抗 10 ml (1 : 1 000 稀释) 室温孵育 2 h, 二抗 10 ml (1 : 5 000 稀释) 室温孵育 2 h 后具体步骤如参考文献^[5]。

1.2.4 Tim 3 过表达对 poly (I : C) 活化小鼠 Kupffer 细胞炎性因子分泌的影响 将 1.2.3 转染质粒 pcDNA3.1-Tim 3 的 Kupffer 细胞, 调整浓度至 5×10^4 /ml, 接种于 96 孔培养板中, 每组 3 个复孔, 37 °C、5% CO₂ 培养过夜; 加入 poly (I : C) 至终浓度 50 ng/ml, 于 24 h 后收集培养上清液用于 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 检测。具体步骤如参考文献^[5]。

1.2.5 Western blot 法检测 Tim 3 对小鼠的 Kupffer 细胞 NF- κ B P65 蛋白表达的影响 收集 1.2.3 中的细胞裂解液, Western blot 法检测 NF- κ B P65 蛋白水平的变化, 操作过程如参考文献^[5]。一抗 10 ml (1 : 2 000) 室温孵育 2 h, 二抗 10 ml (1 : 4 000) 室温孵育 2 h。

1.2.6 抑制 NF- κ B 通路后对 Tim 3 抑制小鼠 Kupffer 细胞因子产生的影响 将小鼠 Kupffer 细胞加入吡咯烷二硫基甲酸盐 (PDTC) 至终浓度 30 μ mol/L, 预处理 0.5 h, 转染质粒 pcDNA3.1-Tim 3, 接种于 96 孔培养板中; 最后加入 poly (I : C) 至终浓度 50 ng/ml, 于 24 h 收集培养上清液, ELISA 法检测细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量。检测方法如参考文献^[5]。

1.2.7 抑制 NF- κ B 通路对封闭 Tim 3 后小鼠 Kupffer 细胞因子产生的影响 将转染 pcDNA3.1-Tim 3 的 Kupffer 细胞, 调整浓度至 5×10^4 /ml, 接种于 96 孔培养板中; 37 °C、5% CO₂ 培养过夜; 弃去原有培养基, 加入兔抗鼠 Tim-3 单克隆抗体或同型对照羊 IgG 5 ng/ml 的培养基, 同时加入 PDTC 至终浓度 30 μ mol/L, 培养 24 h 收集上清液用于 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 检测。检测方法如参考文献^[5]。

1.2.8 细胞培养及分组 细胞用含 10% 的小牛血清 RPMI 1640 常规培养, 实验所用细胞均处于对数生长期, 分成 3 组, 包括正常对照组 (仅加等量转染试剂)、pcDNA3.1-Tim 3 组和 pcDNA3.1 组, 每组细胞设 3 个复孔。

1.3 统计学处理 使用 SAS 6.12 软件进行分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析及 LSD-*t* 检验进行多组间均数的比较。

2 结果

2.1 光镜下 Kupffer 细胞形态观察 分离出的 Kupffer 细胞随着培养时间的延长, 细胞形态结构会发生改变。刚分离的 Kupffer 细胞悬浮于培养液中, 呈圆球形, 具有很强的折光性, 形态、大小较一致; 培养 0.5 h 后细胞黏附培养板底部, 部分细胞开始贴壁生长, 培养 6 h 后, 大多数细胞已贴壁生长, 少数细胞开始伸展; 24 h 后, 贴壁细胞已完全伸展, 体积明显增大, 细胞形态呈典型星形、多边形或梭形, 见图 1。

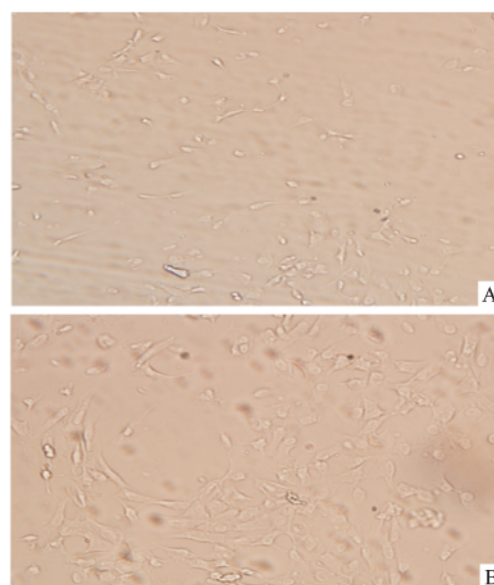


图1 原代培养小鼠 Kupffer 细胞 $\times 200$
A: 培养 6 h; B: 培养 24 h

2.2 poly (I : C) 介导的小鼠 Tim 3 的表达 Real-time PCR 法检测结果显示 10 ng/ml ($F = 20.23$ 、 $P = 0.019$)、20 ng/ml ($F = 29.16$ 、 $P = 0.011$) 和 50 ng/ml ($F = 36.37$ 、 $P = 0.002$) 的 poly (I : C) 介导的小鼠 Kupffer 细胞的 Tim 3 mRNA 含量较 0 ng/ml poly (I : C) 组显著增高 ($P < 0.05$), 见图 2。Western blot 法检测结果显示 10 ng/ml ($F = 20.16$ 、 $P = 0.018$)、20 ng/ml ($F = 28.26$ 、 $P = 0.014$) 和 50 ng/ml ($F = 36.87$ 、 $P = 0.002$) 的 poly (I : C) 介导的小鼠 Kupffer 细胞的 Tim 3 蛋白表达较 0 ng/ml poly (I : C) 组显著增高 ($P < 0.05$), 见图 3。

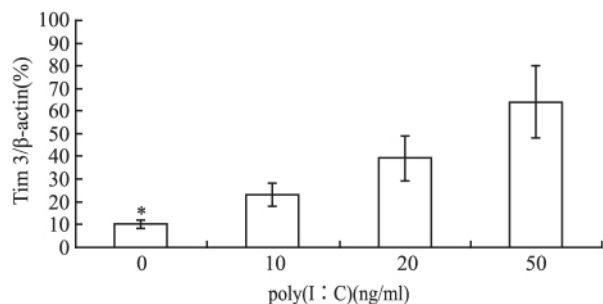


图2 Tim 3 mRNA 的相对表达水平

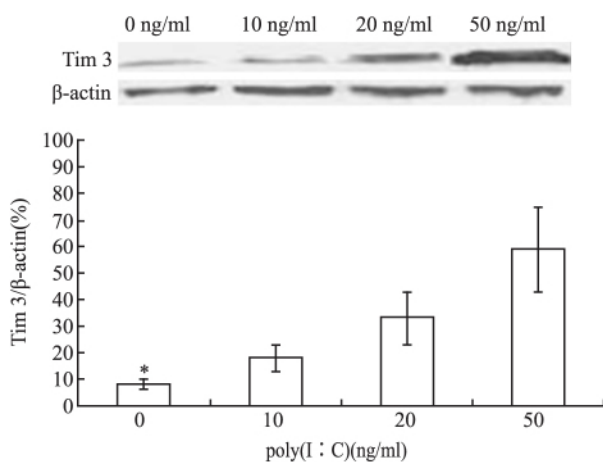
与 poly(I:C) 0 ng/ml 组比较: * $P < 0.05$ 

图3 Tim 3 蛋白的相对表达水平

与 poly(I:C) 0 ng/ml 组比较: * $P < 0.05$

2.3 转染质粒 pcDNA3.1-Tim 3 小鼠 Kupffer 细胞 Tim 3 的表达 Realtime PCR 和 Western blot 分别检测正常对照组、pcDNA3.1 组和 pcDNA3.1-Tim 3 组的 Tim 3 mRNA 的相对表达量,与 pcDNA3.1 组、正常对照组比较,pcDNA3.1-Tim 3 组的 Tim 3 mRNA 表达显著增加,pcDNA3.1 组 mRNA 表达量为其 21% ($F = 46.17$, $P = 0.012$),正常对照组 mRNA 表达量为其 12% ($F = 66.35$, $P = 0.002$),见图 4。pcDNA3.1-Tim 3 组中 Tim 3 蛋白的表达明显高于正常对照组,经灰度扫描分析,pcDNA3.1 组蛋白表达量为其 31% ($F = 39.24$, $P = 0.019$),正常对照组蛋白表达量为其 32% ($F = 36.35$, $P = 0.019$)。见图 5。

2.4 Tim 3 过表达对 poly(I:C) 活化小鼠 Kupffer 细胞的炎症因子表达影响 ELISA 结果显示,转染质粒 pcDNA3.1-Tim 3 的小鼠 Kupffer 细胞经 poly(I:C) 活化后炎症因子表达发生了变化,pcDNA3.1-Tim 3 组的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 分泌炎症性

因子较 pcDNA3.1 组 ($F = 30.16$, $P = 0.023$)、正常对照组 ($F = 33.36$, $P = 0.021$) 明显下降,这表明 Tim 3 能抑制 Kupffer 细胞的活化,见图 6。

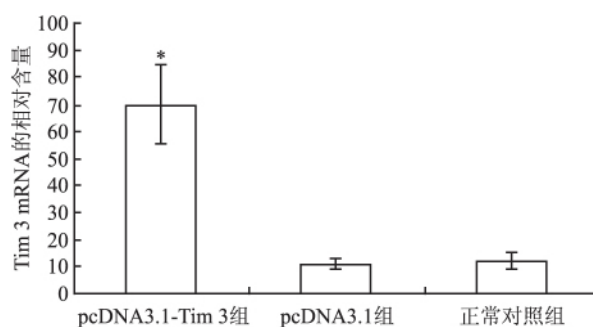
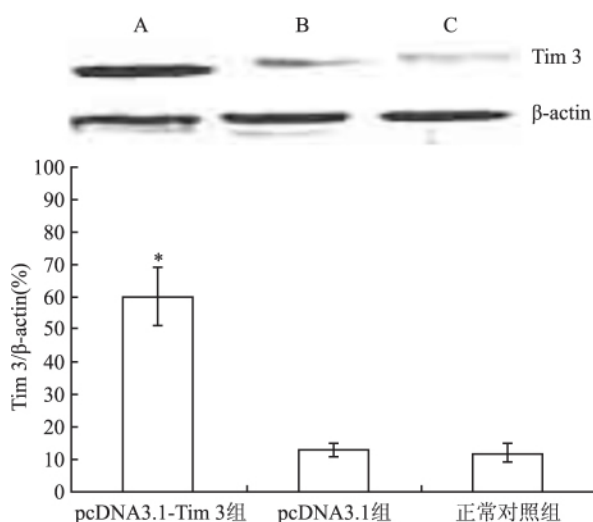


图4 Tim 3 mRNA 的相对表达水平

与正常对照组比较: * $P < 0.05$ 图5 Tim 3 蛋白的相对表达水平 ($n = 3$)

A: pcDNA3.1-Tim 3 组; B: pcDNA3.1 组; C: 正常对照组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$

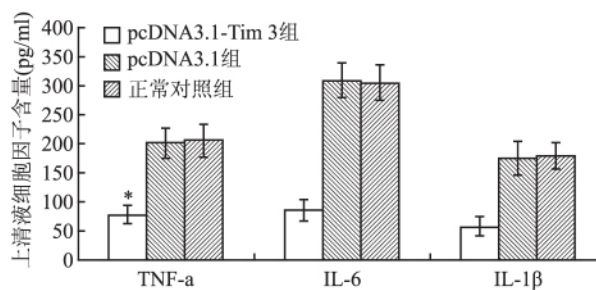


图6 Tim 3 过表达对小鼠 Kupffer 细胞炎症因子表达的影响

与正常对照组比较: * $P < 0.05$

2.5 Tim 3 对小鼠 Kupffer 细胞的 NF- κ B P65、I κ B α 蛋白表达的影响 pcDNA3.1-Tim 3 转染小鼠 Kupffer 细胞后经 poly(I:C) 刺激,Western blot 检测

显示 pcDNA3.1-Tim 3 组细胞的 p53 蛋白的表达从 poly(I:C) 刺激 6 h 后均低于 pcDNA3.1 组、正常对照组,见图 7;而 IkB α 的表达量与之相反,随着时间的延长其表达量逐渐升高,从 poly(I:C) 刺激 6 h 后高于正常对照组细胞,见图 8。可见 Tim 3 抑制了 NF- κ B 通路的活化。

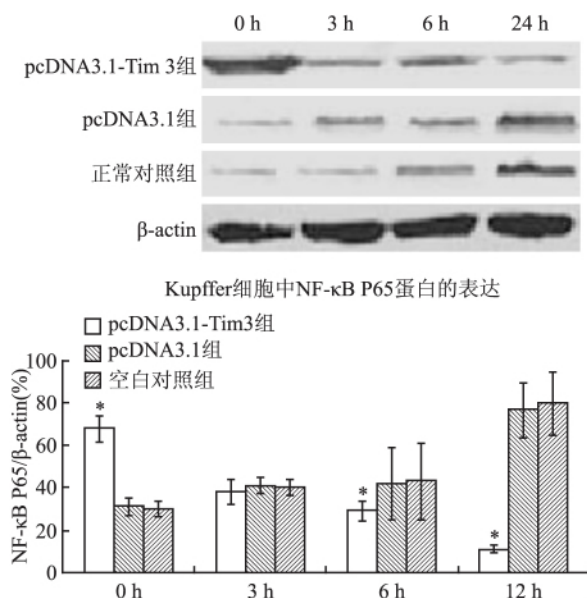


图 7 Tim 3 对 Kupffer 细胞 NF- κ B P53 蛋白表达的影响
与正常对照组比较: * $P < 0.05$

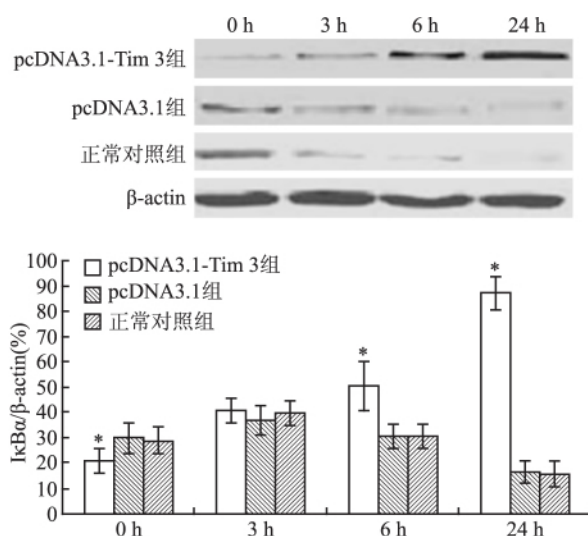


图 8 Tim 3 对 Kupffer 细胞 IkB α 蛋白表达的影响
与正常对照组比较: * $P < 0.05$

2.6 抑制 NF- κ B 通路后对 Tim 3 上调小鼠 Kupffer 细胞炎症因子产生的影响 NF- κ B 抑制性配体 PDTC 预处理转染质粒 pcDNA3.1-Tim 3 的小鼠 Kupffer 细胞 30 min 后,经 poly(I:C) 刺激后,

ELISA 结果显示 PDTC 预处理组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 分泌较正常对照组无明显变化,见图 9,PDTC 未处理组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 分泌减少,差异有统计学意义,见图 6。可见 Tim 3 通过 NF- κ B 通路抑制炎症细胞因子分泌。

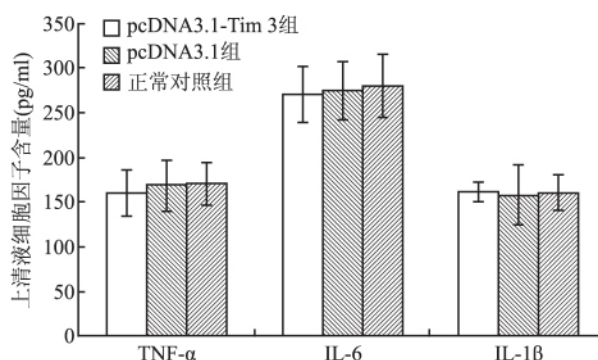


图 9 NF- κ B 通路对小鼠 Kupffer 细胞炎症因子表达的影响

2.7 阻断 NF- κ B 通路逆转 Tim 3 阻断型抗体对 poly(I:C) 介导的 Kupffer 细胞分泌细胞因子的促进作用 为了研究阻断 Tim 3 是否通过 NF- κ B 通路影响 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的分泌,利用 PDTC 预处理 pcDNA3.1-Tim 3 组 30 min 后,然后加入 Tim 3 阻断型抗体处理,经 poly(I:C) 刺激后,收集培养上清液,ELISA 结果显示,PDTC 未处理组, Tim 3 阻断型抗体组与未加 Tim 3 阻断型抗体组比较, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的分泌增加 ($P < 0.05$),见图 10A;而 PDTC 预处理组, Tim 3 阻断型抗体组与未加 Tim 3 阻断型抗体组比较, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 分泌差异无统计学意义,见图 10B。

3 讨论

Kupffer 细胞是指存在于肝脏血窦内皮间的巨噬细胞,活性程度很高,在细菌脂多糖等激活下,可以释放多种细胞因子,从而激活多种炎症细胞,共同在肝脏的炎症反应中发挥作用^[6-7]。肝衰竭综合征的临床特点和结局取决于 Kupffer 细胞的比例、释放炎症因子的种类^[8]。因而,深入肝巨噬细胞的活化及调控机制对治疗肝损失具有重要意义。

Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR) 蛋白代表了一类保守的受体家族,分别识别不同的抗原。其中 TLR3 能专一地识别 poly(I:C),激活 NF- κ B 通路,促发炎症因子及辅助刺激分子的释放,调节机体单核/巨噬细胞。TLR 下游信号通路的关键节点就

是 NF- κ B 蛋白,在免疫反应中发挥重要作用,最突出的生物学功能是促进细胞因子合成和释放。poly(I:C)通过细胞膜表面的 TLR3 激活炎性细胞,核内 NF- κ B 通路被激活,合成大量炎性细胞因子并释放到胞外,趋化粒细胞、巨噬细胞,同时使得毛细血管通透性增加,引起炎症反应^[9-10]。

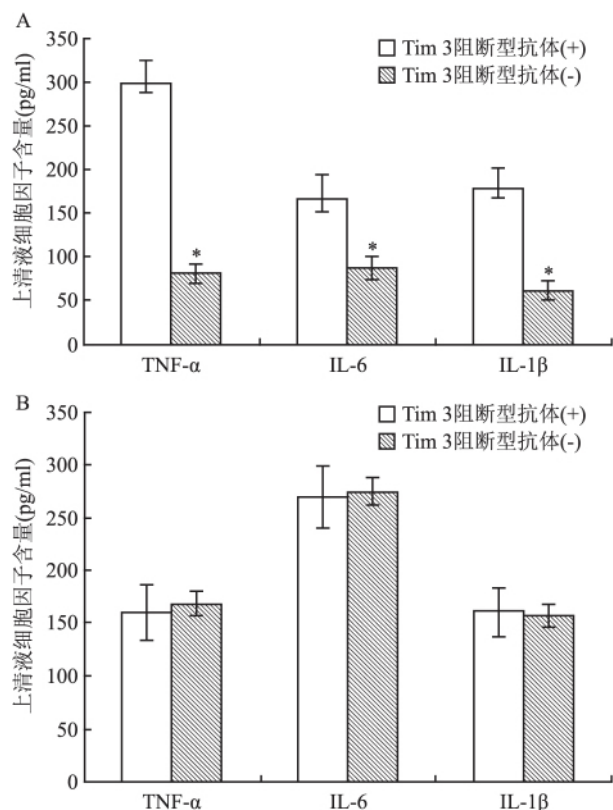


图 10 阻断 NF- κ B 通路逆转 Tim 3 阻断型抗体对 Kupffer 细胞分泌炎性因子的促进作用

A: PDTC 未预处理组; B: PDTC 预处理组; 与 Tim 3 阻断型抗体预处理比较: * $P < 0.05$

Tim 3 属于 T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白 (Tim) 家族成员,是活化的 Th1 细胞表面的共刺激分子^[11]。Tim 3 和配体 Gal9 结合构成 Tim 3-Gal9 信号通路,引起 T 细胞的凋亡,并能激活天然免疫细胞,从而在先天性免疫反应和获得性免疫反应中发挥重要作用。Tim 3 分子对 Th1 细胞起负性调节作用,参与了特异性免疫应答。近年来研究^[12-14]显示, Tim 3 在巨噬细胞、DC、肥大细胞等天然免疫细胞表面有表达,在先天性免疫反应和获得性免疫反应中发挥重要作用。

在 Kupffer 细胞中, Tim 3 通路是否与 poly(I:C) / TLR3 活化 NF- κ B 蛋白的调节有关联, 本实验

结果显示 poly(I:C) 能够诱导小鼠肝 Kupffer 细胞中 Tim 3 mRNA 的表达, 并且随着 poly(I:C) 浓度的增加, Tim 3 mRNA 明显升高。

鉴于 Tim 3 基因在 poly(I:C) 活化的小鼠肝 Kupffer 细胞中的表达及与 NF- κ B 通路间的有调控关系, 本研究应用真核表达载体 pcDNA3.1-Tim 3 转染小鼠肝脏 Kupffer 细胞, Realtime PCR 及 Western blot 法检测结果表明构建的 pcDNA3.1-Tim 3 质粒有效表达 Tim 3 mRNA 和蛋白。用 pcDNA3.1-Tim 3 调高小鼠肝脏 Kupffer 细胞 Tim 3 的表达后, 从细胞水平来观察相关细胞因子的变化, 实验结果提示 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著下降, 表明 Tim 3 抑制小鼠肝脏 Kupffer 细胞炎性因子的分泌。Western blot 检测显示, pcDNA3.1-Tim 3 组细胞的 NF- κ B 蛋白的表达明显低于对照组细胞, 可见 Tim 3 抑制了 NF- κ B 通路的活化。

为了进一步探讨过表达 Tim 3 通过 NF- κ B 通路抑制 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的分泌, 利用 NF- κ B 抑制性配体预处理小鼠 Kupffer 细胞后转染 pcDNA3.1-Tim 3, 经 poly(I:C) 活化, 显示 NF- κ B 抑制性配体未处理组与处理组细胞比较, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的分泌明显下调。

在上面研究的基础上, 为了明确阻断 Tim 3 是否通过 NF- κ B 通路影响 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的分泌, 利用 NF- κ B 抑制性配体预处理小鼠 Kupffer 细胞, 然后加入 Tim 3 阻断型抗体处理, 经 poly(I:C) 活化后, NF- κ B 抑制性配体未处理组, Tim 3 阻断型抗体 (+) 组与 Tim 3 阻断型抗体 (-) 组比较, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的分泌增加; 而 NF- κ B 抑制性配体处理组, Tim 3 阻断型抗体 (+) 组与 Tim 3 阻断型抗体 (-) 组比较, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 分泌差异无统计学意义, 进一步说明了 Tim 3 通过 NF- κ B 通路抑制小鼠 Kupffer 细胞的炎性因子的分泌。

在本研究中, 成功实现了采用真核表达质粒 pcDNA3.1-Tim 3 转染小鼠 Kupffer 细胞, 并观察到 Tim 3 通过 NF- κ B 通路对 poly(I:C) 活化的小鼠 Kupffer 细胞的炎性因子分泌的抑制作用, 本实验结果为进一步深入阐明 Kupffer 细胞活化的调控机制提供了帮助, 研究该分子靶标对临床诊断肝损伤进程和治疗有重要意义, 有望为肝损伤的诊断和治疗提供新思路。

参考文献

- [1] Dabo S , Meurs E F. DsRNA-dependent protein kinase PKR and its role in stress , signaling and HCV infection[J]. *Viruses* ,2012 ,4 (11) : 2598 – 635.
- [2] Pfaller C K , Li Z , George C X , et al. Protein kinase PKR and RNA adenosine deaminase ADAR1: new roles for old players as modulators of the interferon response [J]. *Curr Opin Immunol* , 2011 ,23(5) : 573 – 82.
- [3] Chae S C , Park Y R , Lee Y C , et al. The association of TIM-3 gene polymorphism with atopic disease in Korean population [J]. *Hum Immunol* 2004 ,65(12) : 1427 – 31.
- [4] Liu H , Cao H , Wu Z Y. Isolation of Kupffer cells and their suppressive effects on T lymphocyte growth in rat orthotopic liver transplantation [J]. *World J Gastroenterol* ,2007 ,13 (22) : 3133 – 6.
- [5] Niu J , Yue W , Song Y , et al. Prevention of acute liver allograft rejection by IL-10-engineered mesenchymal stem cells [J]. *Clin Exp Immunol* ,2014 ,176(3) : 473 – 84.
- [6] Raza H , John A , Shafarin J. NAC attenuates LPS-induced toxicity in aspirin-sensitized mouse macrophages *via* suppression of oxidative stress and mitochondrial dysfunction[J]. *PLoS One* ,2014 ,9 (7) : e103379.
- [7] Su G L , Goyert S M , Fan M H , et al. Activation of human and mouse Kupffer cells by lipopolysaccharide is mediated by CD14 [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* ,2002 ,283 (3) : G640 – 5.
- [8] Zimmermann H W , Trautwein C ,Tacke F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury [J]. *Front Physiol* ,2012 ,3: 56 – 8.
- [9] Sarlos P ,Kovesdi E ,Magyari L , et al. Genetic update on inflammatory factors in ulcerative colitis: Review of the current literature [J]. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014 ,5(3) : 304 – 21.
- [10] Takeda K , Kaisho T , Akira S. Toll-like receptors [J]. *Annu Rev Immunol* ,2003 ,21: 335 – 76.
- [11] Wu Y L , Lian L H , Wan Y , et al. Baicalein inhibits nuclear factor- κ B and apoptosis *via* c-FLIP and MAPK in D-GalN/LPS induced acute liver failure in murine models [J]. *Chem Biol Interact* 2010 ,188(3) : 526 – 34.
- [12] Kim M J , Choi N Y , Koo J E , et al. Suppression of Toll-like receptor 4 activation by endogenous oxidized phosphatidylcholine , KOdiA-PC by inhibiting LPS binding to MD2 [J]. *Inflamm Res* , 2013 ,62(6) : 571 – 80.
- [13] Anderson A C. Tim 3 , a negative regulator of anti-tumor immunity [J]. *Curr Opin Immunol* ,2012 ,24(2) : 213 – 6.
- [14] Dar A A , Patil R S , Chiplunkar S V. Insights into the relationship between Toll like receptors and Gamma Delta T cell responses [J]. *Front Immunol* 2014 ,5: 366.

Tim 3 affecting mice liver Kupffer cells secretion by poly(I : C) activation

Niu Jian , Wang Yue , Wang Renhao , et al

(Dept of General Surgery ,The First Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College Xuzhou 221002)

Abstract Objective To investigate the adjustment role of T cell immunoglobulin and mucin family-3(Tim 3) in Kupffer cells activation and the related mechanism. **Methods** Transfected the pcDNA3.1-Tim 3 plasmid into Kupffer cells. Tim 3 expression in Kupffer cell was examined by Realtime PCR and Western blot. Plasmid pcDNA3.1-Tim 3 , Tim 3 blocking antibodies and NF- κ B inhibitory ligands on mice liver Kupffer cell activation factor (TNF- α , IL-1 β , IL-6) were monitored by ELISA test. NF- κ B and I κ B α proteins were examined by Western blot. **Results** Tim 3 could inhibit Kupffer cells expression of TNF- α , IL-6 , IL-1 β . The results showed that it reduced the expression of NF- κ B p65 protein and increased I κ B α protein in the mouse liver Kupffer cells. **Conclusion** Tim 3 is involved in the regulation of Kupffer cells activation through NF- κ B and I κ B α protein.

Key words T cell immune globulin and mucin family-3; Kupffer cell; mice