

· 基础研究 ·

锌指蛋白 A20 对大鼠腹膜透析相关性急性腹膜炎炎症反应的影响*

邹循亮, 鄢巨振, 徐刚, 吴平

(杭州师范大学附属医院肾内科, 杭州 310015)

摘要:目的 探讨锌指蛋白 A20 对脂多糖(LPS)诱导的大鼠腹膜透析相关性急性腹膜炎模型腹膜组织 CD40 表达、I κ B α 磷酸化及腹腔局部炎症反应的影响。方法 将 24 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 6 只。对照组: 腹腔注入 4.25% 葡萄糖乳酸盐腹膜透析液(简称腹透液, 90 mL/kg); LPS 组: LPS 1 mg/kg 腹腔注入 4 h 后, 再注入腹透液; 转染 A20 组及空载体组: 超声微泡转染 pGEM-T easy-A20 或 pGEM-T easy 质粒至大鼠腹膜组织 3 d 后相继注入 LPS 及腹透液。注入腹透液 4 h 后处死大鼠, 留取腹水、壁层及脏层腹膜组织。常规腹膜组织 Masson、HE 染色和腹水白细胞计数; Western blot 检测腹膜组织 A20、p-I κ B α 、I κ B α 、CD40 蛋白的表达; RT-PCR 检测腹膜组织 CD40 mRNA 的表达; ELISA 法检测腹水中 IL-6 水平。结果 LPS 可诱导腹膜组织表达 A20。与 LPS 组及空载体组相比, 转染 A20 组大鼠腹膜组织水肿明显减轻, 炎细胞浸润及腹水白细胞计数均减少, 腹膜组织 p-I κ B α /I κ B α 比值、CD40 mRNA 及蛋白表达、腹水 IL-6 水平均明显降低($P < 0.05$); 与对照组相比, 转染 A20 组腹膜组织 p-I κ B α /I κ B α 比值和腹水 IL-6 水平差异无统计学意义($P > 0.05$), 但 CD40 mRNA 及蛋白表达明显升高($P < 0.05$)。结论 大鼠腹膜组织过表达 A20 可抑制 LPS 诱导的大鼠急性腹膜炎炎症反应, 并对 LPS 信号通路中相关功能蛋白起一定的调控作用。

关键词: 腹膜炎; 腹膜透析; 锌指蛋白 A20; I κ B α ; CD40

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.31.024

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)31-3788-04

Effects of zinc finger protein A20 on the inflammatory reaction in rats with peritoneal dialysis-related acute peritonitis*

Zou Xunliang, Yan Juzhen, Xu Gang, Wu Ping

(Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310015, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of zinc finger protein A20(A20) on the expression of CD40 and the phosphorylation of I κ B α as well as the local inflammatory reaction of abdominal cavity in Sprague Dawley(SD) rats with peritoneal dialysis-related acute peritonitis induced by lipopolysaccharide(LPS). **Methods** 24 male SD rats were equally randomized to four groups ($n = 6$, each). Control group: injected with 4.25% dextrose peritoneal dialysate(PDF) via abdominal cavity(90 mL/kg); LPS group: injected with LPS(1 mg/kg) via abdominal cavity 4 hour later followed by PDF injection; transfection A20 plasmid group and empty plasmid group: after transfer pGEM-T easy-A20 or pGEM-T easy plasmid via intraperitoneally using an ultrasound-microbubble-mediated system for 3 days, then injected with LPS and PDF via abdominal cavity. The rats were killed 4 hours after PDF injection. Peritoneum tissue was stained using Masson and HE. Leucocytes count in abdominal dropsy was performed. The proteins expression of A20, p-I κ B α , I κ B α , and CD40 in peritoneum tissue were analyzed by western blot; the expression of CD40 mRNA in peritoneum tissue were determined by RT-PCR; IL-6 level in abdominal dropsy was determined by ELISA. **Results** LPS could induce the protein expression of A20 in rats peritoneum tissue. Compared with LPS group and empty plasmid group, the degree of edema, inflammatory cells infiltration, and the ratio of p-I κ B α /I κ B α , mRNA and protein expression of CD40 in rats peritoneum as well as leucocyte counts and IL-6 level of abdominal dropsy were also significantly decreased in transfection A20 plasmid group ($P < 0.05$); meanwhile, compared with control group, that of the ratio of p-I κ B α /I κ B α and IL-6 level in transfection A20 plasmid group were no significant difference ($P > 0.05$), but the mRNA and protein expression of CD40 were significantly higher than that of control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Over expression of A20 in SD rats peritoneum tissue could down-regulate the inflammatory reaction in peritonitis induced by LPS, which might be involved in modulating the expression of associated functional protein during LPS signal pathway.

Key words: peritonitis; peritoneal dialysis; zinc finger protein A20; I κ B α ; CD40

细菌性腹膜炎是持续性不卧床腹膜透析(CAPD)的主要并发症之一,亦是导致透析失败的主要原因之一。革兰阴性细菌产生的脂多糖(LPS)是导致腹膜炎的强力介质。LPS可与 Toll 样受体(TLR)4 结合,激活核转录因子- κ B(NF- κ B),诱导促炎性细胞因子的产生,导致腹膜间皮细胞(RPMCs)CD40 及白细胞介素-6(IL-6)等表达增高,发生炎症反应^[1]。

锌指蛋白 A20 是 TLR 下游信号效应的负性调节者,可负性调节 NF- κ B 活性。作者已在体外实验证实,大鼠 RPMCs 过

表达 A20 可抑制 LPS 诱导的 RPMCs 炎症效应^[2]。本文旨在从体内实验进一步探讨 A20 对 LPS 诱导的大鼠急性腹膜透析相关性腹膜炎炎症反应的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 SD 雄性大鼠(250~350 g),由杭州师范大学动物实验中心提供。

1.1.2 主要试剂及仪器 4.25% 葡萄糖乳酸盐腹透液(美国,

Baxter), LPS(美国, Sigma), SABC 组化反应试剂盒(武汉, 博士德), 细胞裂解液(美国, CST), 兔抗大鼠 A20 抗体(美国, CST), 兔抗大鼠 p-IκBα 抗体、IκBα 抗体(美国, CST), 兔抗大鼠 CD40 抗体(美国, Abbiotec), 小鼠抗大鼠 β-actin 抗体(武汉, 博士德), 山羊抗兔 IgG(丹麦, Dako), 山羊抗小鼠 IgG(美国, CST), Trizol 试剂盒(美国, Invitrogen), RNA 逆转录试剂盒(立陶宛, Fermentas), 质粒提取试剂盒(美国, QIAGEN Plasmid Mega Kit), 发泡剂(意大利, Milano), 超声仪(比利时, FYSIOMED Sonic15C), 大鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(奥地利, Bender MedSystems), A20 质粒(pGEM-T easy-A20)由上海捷瑞生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 体内基因转染 按试剂盒说明书提取 pGEM-T easy-A20 质粒, 将提取的质粒用生理盐水稀释; 每支发泡剂用 5 mL 生理盐水溶解, 二者以体积比 1:1 充分混匀, A20 终浓度为 100 μg/mL, 以 6 mL 注入大鼠腹腔后体外超声处理。方法简述: 10%水合氯醛麻醉, 腹腔内注射外源基因 A20 混合物充分按摩腹部, 涂整合剂, 首先选择 1 MHz 超声, 超声输出功率为 2.6 W/cm², 输出频率为 10%, 超声 8 min, 过程中不断变换超声位置, 完成以上操作后, 将大鼠腹部朝下, 使液体聚集于壁层腹膜处, 再超声 5 min。最后选择 3 MHz 超声, 输出功率和输出频率不变, 超声 5 min。

1.2.2 实验模型及分组 24 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 6 只。(1)对照组; (2)LPS 组; (3)转染 A20 组(pGEM-T easy-A20 + LPS); (4)空载体组(pGEM-T easy + LPS)。各组受试因素如下: 对照组腹腔注入腹透液(90 mL/kg); LPS 组腹腔注入 LPS(无菌生理盐水稀释)1 mg/kg, 4 h 后再注入腹透液(90 mL/kg), 建立腹透相关性急性腹膜炎模型^[3]; 转染 A20 组及空载体组在基因转染 3 d 后建模, 然后相继注入 LPS 及腹透液; 各组腹透液留腹 4 h 后乙醚麻醉下处死动物。留取腹水、肠系膜组织 -80 °C 冻存, 腹腔前壁壁层腹膜及脏层腹膜以 4%多聚甲醛固定用于常规病理检测。

1.2.3 腹膜组织 Masson、HE 染色 取石蜡包埋的壁层及脏层腹膜组织, 4 μm 切片, 60 °C 烘干融蜡, 二甲苯脱蜡, 乙醇梯度脱水, 常规 Masson、HE 染色, 光镜下观察腹膜组织病理改变。

1.2.4 腹水白细胞计数 采用血细胞计数板计数。

1.2.5 Western blot 检测腹膜组织 A20、p-IκBα、IκB、CD40、β-actin 蛋白表达 取液氮内冻存的脏层腹膜组织约 100 mg, 研磨后加入细胞裂解液, 4 °C, 14 000 g 离心 15 min, 以 BCA 法检测上清中蛋白水平。取等量蛋白与 2×上样缓冲液混合煮沸 10 min 后上样, 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳后以 400 mA, 4 °C, 1 h, 电转膜于硝酸纤维素膜, 以含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭 60 min 后, 分别加入兔抗大鼠 A20 抗体(1:1 000), 兔抗大鼠 p-IκBα、IκB 抗体(1:1 000), 兔抗大鼠 CD40(1:500), 小鼠抗大鼠 β-actin 抗体(1:2 000), 山羊抗兔 IgG(1:1 000)、山羊抗小鼠 IgG(1:1 000), 室温孵育 1 h, 洗膜, 显影、定影。自动成像系统成像并分析。实验重复 6 次。

1.2.6 RT-PCR 检测腹膜组织 CD40 mRNA 的表达 按 Trizol 试剂盒提供的方法提取大鼠腹膜组织标本总 RNA, 取 2 μL 总 RNA 按逆转录试剂盒操作说明合成 cDNA。PCR 反应条件如下: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 36 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。取 4 μL PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳, 凝胶自动成像仪进行成像并分析。实验重复 6 次。PCR 引物由 premier 5.0 软件设计, 上海生工生物公司合成, 以 GAPDH 为内参。见表 1。

1.2.7 ELISA 法检测腹水 IL-6 蛋白水平 按照 IL-6 ELISA 试剂盒操作说明测定大鼠腹水中 IL-6 蛋白水平, 450 nm 波长进行 ELISA 读数, IL-6 水平计算结果以 pg/mL 表示。实验重复 6 次。

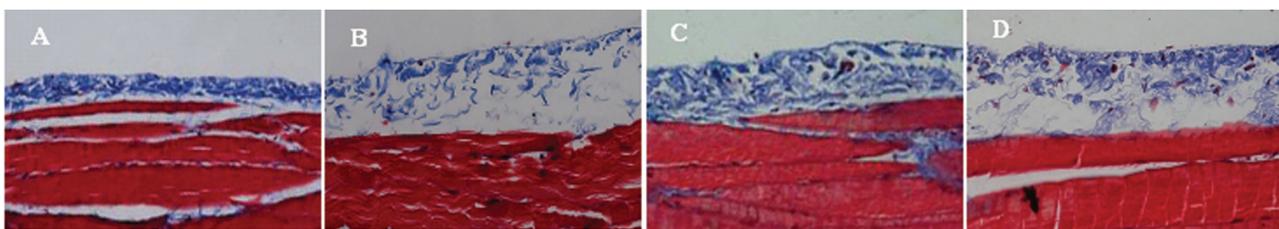
1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示或以中位数和范围表示。两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间均数比较用方差(ANOVA)分析或 Kruskal Wallis 检验分析, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 A20 过表达对腹膜炎大鼠腹膜组织结构病理改变的影响 Masson 染色见 LPS 组及空载体组壁层腹膜组织明显水肿, 而转染 A20 组腹膜组织水肿明显减轻, 见图 1。HE 染色见 LPS 组及空载体组脏层腹膜组织间质水肿明显, 可见大量的淋巴细胞及浆细胞弥漫性浸润, 毛细血管极度扩张充血; 而转染 A20 组腹膜组织间质水肿较轻, 可见散在的淋巴细胞及浆细胞浸润, 毛细血管轻度扩张充血, 见图 2。

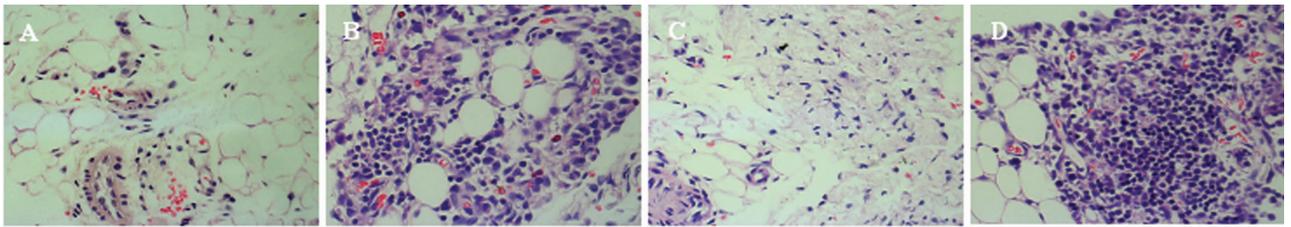
表 1 PCR 引物序列和扩增产物

引物	正义链	反义链	扩增产物(bp)
CD40	5'-GTGTGTTACGTGCAGTGACAA-3'	5'-ATCCTCACAGCTTGCCA-3'	442
GAPDH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'	452



A:对照组; B:LPS 组; C:转染 A20 组; D:空载体组。

图 1 4 组大鼠壁层腹膜组织结构比较(Masson 染色×400)

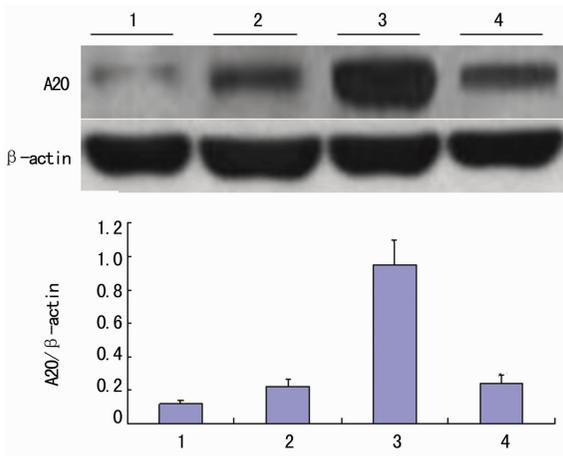


A:对照组;B:LPS组;C:转染 A20 组;D:空载体组。

图 2 4 组大鼠脏层腹膜组织结构比较 (HE 染色×200)

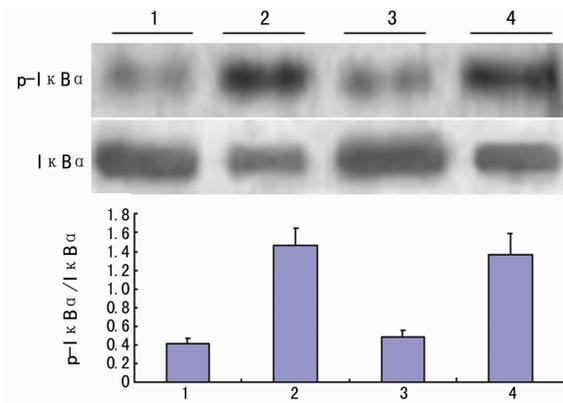
2.2 A20 过表达对腹膜炎大鼠腹水白细胞计数的影响 与对照组[中位数 $10.08 \times 10^5/\text{mL}$, 范围 $(5.75 \sim 17.67) \times 10^5/\text{mL}$]相比, LPS 组[中位数 $17.59 \times 10^5/\text{mL}$, 范围 $(11.47 \sim 39.65) \times 10^5/\text{mL}$]及空载体组[$18.93 \times 10^5/\text{mL}$, 范围 $(11.56 \sim 35.78) \times 10^5/\text{mL}$]腹水白细胞计数显著增加 ($P < 0.01$); 与 LPS 组及空载体组相比, 转染 A20 组[中位数 $11.36 \times 10^5/\text{mL}$, 范围 $(8.68 \sim 25.85) \times 10^5/\text{mL}$]腹水白细胞计数显著减少 ($P < 0.05$), 接近对照组水平 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠腹膜组织 A20 蛋白表达比较 与对照组相比, LPS 组及空载体组 A20 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$); 基因转染 3 d 后, 与 LPS 组及空载体组相比, 转染 A20 组 A20 蛋白升高更明显 ($P < 0.01$)。见图 3。



1:对照组;2:LPS组;3:转染 A20 组;4:空载体组。

图 3 各组大鼠腹膜组织 A20 蛋白表达比较

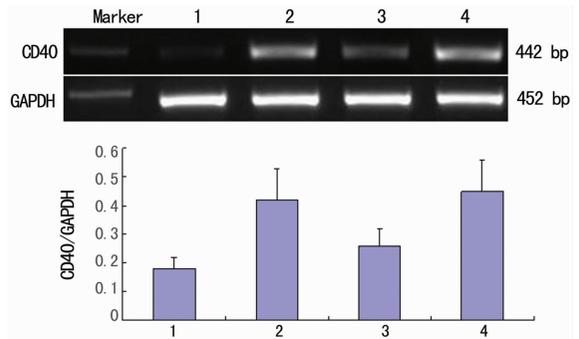


1:对照组;2:LPS组;3:转染 A20 组;4:空载体组。

图 4 4 组大鼠腹膜组织 IκBα 蛋白表达比较

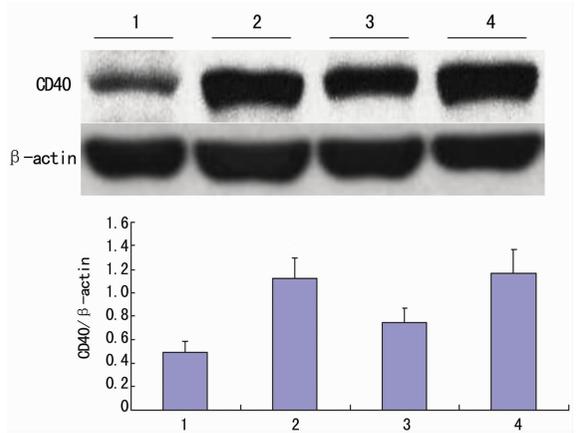
2.4 A20 过表达对腹膜炎大鼠腹膜组织 IκBα 蛋白磷酸化的影响 LPS 组及空载体组 p-IκBα/IκBα 比值与对照组相比明显升高 ($P < 0.01$); 转染 A20 后, p-IκBα/IκBα 比值与 LPS 组及空载体组相比显著降低 ($P < 0.01$), 与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4。

2.5 A20 过表达对腹膜炎大鼠腹膜组织 CD40 mRNA 和蛋白表达的影响 LPS 组及空载体组 CD40 mRNA 和蛋白表达与对照组相比显著升高 ($P < 0.01$); 转染 A20 后与 LPS 组及空载体组相比, 可降低 CD40 mRNA 和蛋白表达 ($P < 0.05$), 但仍高于对照组 ($P < 0.05$)。见图 5、6。



1:对照组;2:LPS组;3:转染 A20 组;4:空载体组。

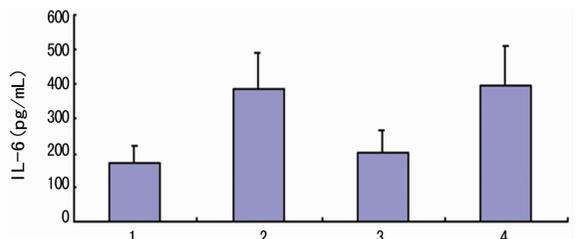
图 5 4 组大鼠腹膜组织 CD40 mRNA 表达比较



1:对照组;2:LPS组;3:转染 A20 组;4:空载体组。

图 6 4 组大鼠腹膜组织 CD40 蛋白表达比较

2.6 A20 过表达对腹膜炎大鼠腹膜组织 IL-6 蛋白分泌的影响 LPS 组及空载体组腹水 IL-6 水平与对照组相比显著升高 ($P < 0.05$); 转染 A20 后腹水 IL-6 水平与 LPS 组及空载体组相比明显降低 ($P < 0.05$), 与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 7。



1:对照组;2:LPS组;3:转染 A20 组;4:载体组。

图 7 4 组大鼠腹膜组织 IL-6 蛋白表达比较

3 讨 论

CAPD 是治疗慢性肾衰竭的重要措施之一, RPMCs 对维持腹膜结构和功能完整性起重要作用, 在腹膜炎炎症反应中起主导地位^[4]。腹膜炎时, RPMCs 通过释放促炎性细胞因子等炎症介质, 加重炎症反应。

A20 是一种胞浆蛋白, 在各种炎症性疾病及其进展过程中发挥负性调节作用。各种活化 NF- κ B 的刺激因素均可诱导多种细胞表达 A20。A20 基因缺陷鼠对亚致死量肿瘤坏死因子 (TNF) 极其敏感, 易导致严重的多脏器炎症反应。A20 对 TNF 受体和 TLR/IL-1R 途径活化的 NF- κ B 活性产生即时调控作用, 负反馈调节 NF- κ B 诱导的炎症反应^[5]。

作者用超声微泡转染 A20 基因至大鼠腹膜组织, 结果显示, 转染 3 d 后大鼠腹膜组织 A20 蛋白表达显著增高, 且过表达 A20 可显著抑制 LPS 诱导的腹膜炎炎症效应, 减轻腹膜组织水肿、炎细胞浸润程度, 减少腹水白细胞计数。提示 A20 在腹膜炎时可发挥局部防御效应。

Oshima 等^[6]研究表明, A20 是一种即早反应基因, 早期负性调节 TLR5 信号介导的肠上皮细胞炎症反应, 可能在先天免疫反应中发挥与其他负性调节因子相互联系的桥梁作用。本研究结果显示, LPS 可迅速诱导大鼠腹膜组织 A20 蛋白表达增高, 但外源性 A20 基因在腹膜组织高表达后不受 LPS 刺激的影响, 提示 A20 在炎症状态下早期发挥内源性调节系统的作用。在 LPS 诱导肝组织损伤中, 吴丽娟等^[7]证实 A20 蛋白表达的意义在于抑制炎症、减轻肝组织炎症损伤。

NF- κ B 在细胞炎症、免疫、分化、增殖和凋亡过程中调节多种靶基因的表达。A20 是一种泛素编码的蛋白酶, 控制靶蛋白的泛素化及去泛素化过程, 通过转录后修饰作用抑制 NF- κ B 活性^[8]。I κ B α 是 NF- κ B 信号的主要调节者, I κ B α 磷酸化及随后降解是 NF- κ B 信号活化的标志。本研究 Western blot 结果显示, 大鼠腹膜组织过表达 A20 可显著抑制 LPS 诱导的 I κ B α 磷酸化。

CD40 是 TNF 受体 (TNFR) 家族成员之一, 细胞表面膜分子 CD40 是免疫反应中极重要的共刺激分子, RPMCs 功能性表达 CD40, CD40 高表达及活化参与 CAPD 相关性腹膜炎过程^[9]。CD40 与其配体 CD40L 结合, 活化 NF- κ B 信号, 诱导细胞因子和趋化因子产生。在 LPS 作用下, RPMCs 表达 CD40、TNF- α 、IL-6 等增高^[1]。本研究结果显示, A20 可显著抑制 LPS 诱导的 CD40 mRNA 及蛋白的表达, 提示 A20 可在转录及翻译水平调控 CD40 生物学功能。研究表明, B 淋巴细胞表达 A20 可限制 CD40 和 B 细胞受体 (BCR) 的免疫应答, 终止 CD40 触发的 NF- κ B 信号效应^[10]。肝细胞过表达 A20 防治鼠慢性移植肝失功亦与其抑制 CD40 和 CD40L 表达有关^[11]。然而, 在本实验结果中, 虽然 A20 完全抑制 I κ B α 磷酸化, 但并未完全抑制 LPS 诱导的 CD40 mRNA 及蛋白的表达, 可能与 LPS 活化其他信号通路, 如 STAT-1 α 信号途径有关^[12]。大鼠腹膜组织过表达 A20 可显著抑制 LPS 诱导的 IL-6 产生, 提示 A20 可直接抑制 LPS 诱导的急性炎症反应。

本研究中, 作者初步探讨了 A20 在急性腹膜透析相关性

腹膜炎中的保护作用及机制。A20 可负性调节 LPS 诱导的腹膜炎炎症反应, 并对 LPS 信号通路中相关功能蛋白起一定的调控作用, 其确切机制有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Wu J, Yang X, Zhang YF, et al. Angiotensin II upregulates Toll-like receptor 4 and enhances lipopolysaccharide-induced CD40 expression in rat peritoneal mesothelial cells[J]. *Inflamm Res*, 2009, 58(8): 473-482.
- [2] 邹循亮, 鄢巨振, 徐刚, 等. 锌指蛋白 A20 对脂多糖诱导的大鼠腹膜间皮细胞炎症效应的影响[J]. *中国血液净化*, 2012, 11(10): 554-558.
- [3] Korybalska K, Wieczorowska-Tobis K, Polubinska A, et al. L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate: an agent that modulates lipopolysaccharide-induced peritonitis in rats[J]. *Perit Dial Int*, 2002, 22(3): 293-300.
- [4] Devuyst O, Margetts PJ, Topley N. The pathophysiology of the peritoneal membrane[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(7): 1077-1085.
- [5] Shembade N, Ma A, Harhaj EW. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes[J]. *Science*, 2010, 327(5969): 1135-1139.
- [6] Oshima N, Ishihara S, Rumi MA, et al. A20 is an early responding negative regulator of Toll-like receptor 5 signaling in intestinal epithelial cells during inflammation[J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 159(2): 185-198.
- [7] 吴丽娟, 张雪莹, 陈伟, 等. 锌指蛋白 A20 对小鼠内毒素性肝损伤的保护作用研究[J]. *重庆医学*, 2008, 37(3): 232-233.
- [8] Perkins ND. Post-transcriptional modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway[J]. *Oncogene*, 2006, 25(51): 6717-6730.
- [9] Yang X, Ye R, Kong Q, et al. CD40 is expressed on rat peritoneal mesothelial cells and upregulates ICAM-1 production[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(6): 1378-1384.
- [10] Tavares RM, Turer EE, Liu CL, et al. The ubiquitin modifying enzyme A20 restricts B cell survival and prevents autoimmunity[J]. *Immunity*, 2010, 33(2): 181-191.
- [11] Yang J, Xu MQ, Yan LN, et al. Zinc finger protein A20 protects rats against chronic liver allograft dysfunction[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(27): 3537-3550.
- [12] Qin H, Wilson CA, Lee SJ, et al. LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF- κ B and STAT-1 α in macrophages and microglia[J]. *Blood*, 2005, 106(9): 3114-3122.

(收稿日期: 2013-06-12 修回日期: 2013-07-12)

欢迎投稿

欢迎订阅