

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)09-0919-04

脑脊髓损伤大鼠局部 Th1/Th2 细胞相关因子的表达及意义

许燕¹, 李雅贞¹, 张志坚¹, 孙湘兰², 龚爱华¹, 丁红群¹, 卢俊浩¹, 袁泉¹, 许化溪^{1*}(¹江苏大学基础医学与医学技术学院; ²江苏大学科学研究院, 江苏 镇江 212013)

[摘要] 目的 分析大鼠急性脑脊髓性损伤后脑脊髓中 Th1 和 Th2 细胞相关因子的表达水平, 探讨其在持续性二次损伤中可能的作用。方法 制备 SD 大鼠急性脑脊髓性损伤模型, 随机分为损伤组和脂多糖 (LPS) 处理组, 各组又分别对脑和脊髓进行实验处理。用荧光定量 PCR 分别检测不同组别大鼠脑脊髓中 Th1 和 Th2 细胞相关因子, 并进行相关性分析。结果 与对照组相比, 损伤和 LPS 处理的脑组织 Th1 细胞相关的细胞因子 IFN- γ 表达明显增高 ($P < 0.05$), 而 T-bet 的表达并无明显改变; 在损伤和 LPS 处理的脊髓中, IFN- γ 和转录因子 T-bet、HLX 的表达均显著升高 ($P < 0.05$)。无论是脊髓损伤组还是 LPS 处理组, 细胞因子 IL-4 和转录因子 GATA3 均与对照组无异, 呈低表达状态。结论 脑脊髓损伤后呈现不同程度的 Th1 细胞相关因子上调, 尤以可溶性的细胞因子 IFN- γ 为显著, 脊髓损伤时出现 T-bet 与 HLX 表达上调。

[关键词] 脑脊髓损伤; Th1/Th2; 细胞因子; 转录因子; 基因表达

[中图分类号] R392.11, R651.1⁺5, R651.2 **[文献标志码]** A

Expressions and implications of Th1/Th2 cytokines in injured rat brain and spinal cord

XU Yan¹, LI Yazhen¹, ZHANG Zhijian¹, SUN Xianglan², GONG Aihua¹, DING Hongqun¹, LU Junhao¹, YUAN Quan¹, XU Huaxi^{1*}

¹College of Medicine Science and Laboratory Medicine; ²Academy of Science, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

[Abstract] **Objective** To detect the expression levels of Th1/Th2 cytokines in the acute injury of brain and spinal cord in rats, and explore their possible roles in sustained secondary injury. **Methods** The acute brain and spinal cord injury models in SD rats were established and randomly divided into injury group and lipopolysaccharide (LPS) treatment group, and each group was experimentally intervened in the brain and spinal cord, respectively. The mRNA of Th1/Th2 cytokines were determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and analyzed in correlation. **Results** Compared with the control group, in injury and LPS treatment groups, the level of IFN- γ (as a Th1 associated cytokine) in brain tissue significantly increased ($P < 0.05$), while the expression of T-bet did not significantly change; in spinal cord, the levels of IFN- γ and transcription factors T-bet, HLX rose significantly ($P < 0.05$). The cytokine IL-4 and transcription factor GATA3 in both injury and LPS treatment groups were as low as those in the control group. **Conclusion** The expressions of Th1 associated cytokines, especially soluble cytokine IFN- γ , increased in brain and spinal cord injury. The up-regulated T-bet and HLX expressions were only observed in spinal injury.

[Key words] brain and spinal cord injury; Th1/Th2; cytokines; transcription factors; gene expression

创伤性脑、脊髓损伤时有发生, 残死率极高, 其病理过程中非感染性炎症反应起着重要的作用, 直接影响脑、脊髓损伤的预后和转归。由于脑、脊髓损伤非感染性炎症反应的发生机制尚不十分清楚, 因此临床仍缺乏有效的干预手段。有研究显示, 某些炎性细胞因子与脑、脊髓损伤后继发非感染性炎症

密切相关, 后者涉及诸多免疫细胞及其相关的细胞因子和转录因子^[1]。脑、脊髓损伤作为一种内源性的危险信号, 其诱发次生的免疫炎症而介导脑、脊髓二次损伤, 改变损伤类型和加重病理进程^[2]。Th1/Th2 细胞平衡失调与多种免疫相关性疾病的发生发展有着密切的关系, 诸如在支气管哮喘患者存在着

收稿日期: 2013-03-08; 接受日期: 2013-04-19

基金项目: 国家自然科学基金(31270947, 31170849)

作者简介: 许燕(1963-), 女, 江苏无锡人, 副教授, 博士研究生

Tel: 13952853689; E-mail: yanxu63@sina.com

* Corresponding author, 许化溪, E-mail: xuhx@ujs.edu.cn

Th2 细胞极化状态,而在类风湿性关节炎时则出现 Th1 细胞上调^[3-4]。实验性自身免疫性脑脊髓膜炎的研究发现,其致病机制也涉及诸多免疫炎症因子,且 Th1 细胞极化状态关乎炎症的发展。脑及脊髓的机械损伤可介导免疫炎症性次生损伤,尚不清楚这种次生免疫损伤的发生是否像自身免疫性脑脊髓膜炎那样,存在着 Th1 细胞极化状态?此外, Th1 细胞特异性转录因子 T-bet, 及其协同转录因子 H2.0 样同源异形盒(H2.0-like homeobox, HLX), 均是正向调控 Th1 型细胞因子(如 IFN- γ)的重要因素^[5-6], 它们在次生持续性脑脊髓损伤时的变化还不清楚。本研究拟通过分析脑、脊髓损伤大鼠脑脊髓中 Th1 和 Th2 特征性细胞因子和转录因子表达水平的改变,了解脑、脊髓损伤时其局部 T-bet、HLX、IFN- γ 的优势表达状态及其与次生损伤的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 SPF 级 SD 大鼠 60 只均为江苏大学动物中心提供,体质量 250 ~ 320 g, 平均体质量为(285.2 ± 13.1)g, 雌雄不限。随机分成脑、脊髓损伤组和脑、脊髓 LPS 处理组,两组分别设立对照组(脑、脊髓损伤相应的对照组实施假手术; LPS 处理相应对照为生理盐水注射),实验组根据损伤后不同时间点分为 1、3、5、7 d 组,每组 6 只。

1.1.2 主要试剂 Ficoll-泛影葡胺购于中国医学科学院生物工程医学研究所; TRIzol 购于 Invitrogen 公司;实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)试剂、T-A 克隆试剂盒、pMD19-T Vector 均为 TaKaRa 公司产品;质粒小量提取试剂盒为 Macherey-Nagel 公司产品;凝胶回收试剂盒购于 Promega 公司; T-bet、HLX(H2.0-like homeobox)、IFN- γ 、Gata3(GATA 结合蛋白 3, GATA binding protein 3)和 IL-4 以及 β -actin 基因的引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 制作大鼠脑脊髓物理损伤和 LPS 损伤模型 用 3 g/L 戊巴比妥钠(10 mL/kg 体质量)腹腔麻醉后,将动物俯卧固定,以 T12 椎体棘突为中心剪毛、消毒;行背正中切口,分离皮肤及肌肉,暴露 T11 ~ L1 棘突及椎板,用止血钳咬去 T12 棘突及椎板;充分暴露脊髓背侧和两侧,彻底切断脊髓,动物双下肢对称性抽搐,随后出现瘫痪,缝合肌层及皮肤,复制物理损伤模型。LPS 损伤和生理盐水处理模型则是在暴露 T11 ~ L1 棘突及椎板,用止血钳咬去 T12 棘突及椎板,充分暴露脊髓背侧和两侧后于蛛网膜下腔分别注射 LPS 和生理盐水,缝合肌层及皮肤。

1.2.2 总 RNA 提取 分别取实验动物新鲜脑、脊髓组织,加入 TRIzol 试剂匀浆,室温放置 5 min,加入 0.2 mL 氯仿,盖紧 EP 管用用力振荡 15 s,室温放置 10 min; 12 000 g 4℃ 离心 15 min,取上层水相至清洁 EP 管,加 0.5 mL 异丙醇,室温静置 10 min; 12 000 g 4℃ 离心 10 min,胶样 RNA 沉于管底部,

弃上清加 750 mL/L 乙醇 1 mL 涡洗 2 遍; 7 500 g 4℃ 离心 5 min,去乙醇,空气干燥 3 ~ 5 min; 加入 20 μ L 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)水溶解 RNA。

1.2.3 合成 cDNA 每 20 μ L 逆转录体系中含 4 μ g 总 RNA、1 μ L OligodT、2 μ L 10 × Buffer、2 μ L MgCl₂ (25 mmol/L)、2 μ L DTT (0.1 mol/L)、1 μ L dNTPs (10 mmol/L) 及 1 μ L Superscript Reverse Transcriptase II。

1.2.4 qRT-PCR 检测 IFN- γ 、IL-4、T-bet、HLX 和 Gata3 的 mRNA 表达水平 根据已知大鼠 IFN- γ 、IL-4、T-bet、HLX、Gata3 序列,应用 Primer 5 软件设计引物(表 1)。PCR 扩增条件为: 94℃ 预变性 5 min, 1 个循环, 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 (IFN- γ)/62℃ (IL-4)/61℃ (T-bet)/62℃ (HLX)/60℃ (Gata3)/56℃ (β -actin) 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环,最后 72℃ 5 min 结束反应。PCR 扩增结束后,通过温度变化梯度(以 0.5℃/2s 的速度从 72℃ 梯度到 99℃)的荧光监测来分析融解曲线。每个样本重复 3 次,所有反应重复 6 次以确保结果的可重复性。定量和融解曲线的结果用 RotorGene 软件 (Version 4.6) 进行分析。

表 1 引物序列及扩增片段长度

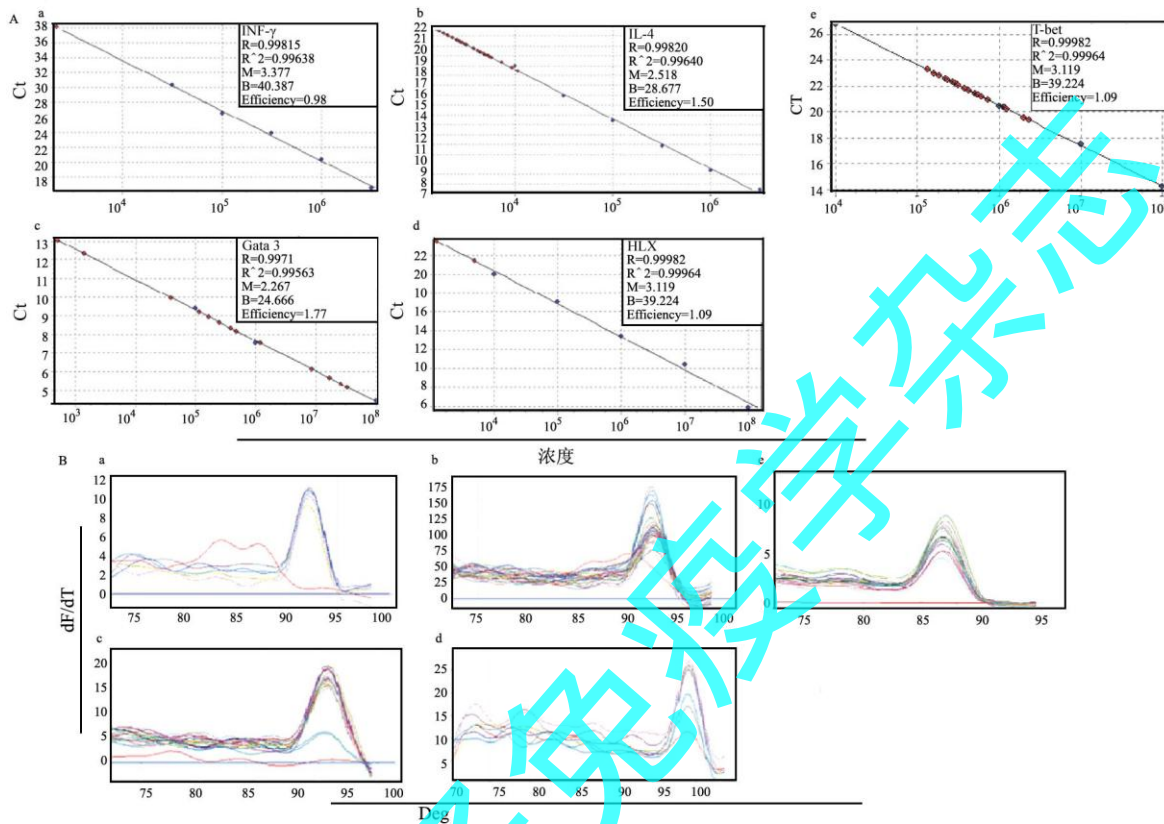
	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
β -actin	F: TCCTGTGGCATCCATGAAACT R: GAAGCATTTCGGT GCACGAT	256
IFN- γ	F: CGTCTGTGTTTTCAGCTC R: ACTCCTTTTCCTCTCCTTA	445
IL-4	F: TGTCTGTACCCCTGTCTGC R: GTTGTGAGCGTGGACTCATTCACG	289
T-bet	F: AACCCAGTATCCTGTTCCACGC R: TGTCCGCACTGGAAGGATAG	442
HLX	F: TTCCAGGTAGAAAATTTCTC R: CCTGCTGGTGGCAGGTCCCT	647
Gata3	F: CAGTCCGCATCTCTTCAC R: TAGTGCCCACTACCATCTC	411

1.2.5 统计学分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两样本均数比较的 *t* 检验对各组 IFN- γ 、IL-4、T-bet、HLX 和 Gata3 的 mRNA 表达水平进行分析,采用 Spearman 秩合检验分析 IFN- γ 、IL-4、T-bet、HLX 和 Gata3 的相关性,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。所有数据均由 SPSS17.0 软件处理。

2 结果

2.1 IFN- γ 、IL-4、T-bet、HLX 和 Gata3 mRNA 表达率 定量检测的标准曲线以及溶解曲线见图 1。脑、脊髓损伤相应的对照组 IFN- γ 、IL-4、T-bet、HLX 和 Gata3 的 mRNA 表达率依次为 100% (6/6)、83.3% (5/6)、83.3% (5/6)、83.3% (5/6)、和 66.7% (4/6); LPS 处理相应对照组 IFN- γ 、IL-4、T-bet、HLX 和 Gata3 的 mRNA 表达率依次为 83.3% (5/6)、83.3% (5/6)、66.7% (4/6)、66.7% (4/6) 和 83.3% (5/6); 脑、脊髓损伤组 IFN- γ 、IL-4、T-bet、HLX 和 Gata3 的 mRNA 表达率依次为 83.3% (20/24)、87.5% (21/24)、87.5% (21/24)、87.5% (21/24)、

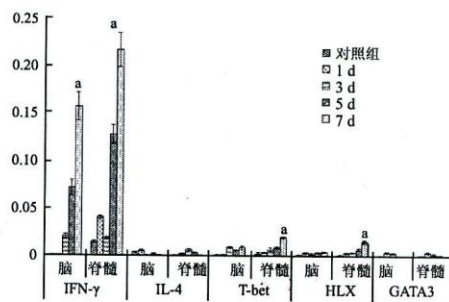
91.7% (22/24); LPS 处理组 IFN- γ 、IL-4、T-bet、HLX 和 Gata3 的 mRNA 表达率依次为 87.5% (21/24)、87.5% (21/24)、83.3% (20/24)、87.5% (21/24)、83.3% (20/24)。



A: 标准曲线; B: 融解曲线. a: IFN- γ ; b: IL-4; c: T-bet; d: Gata3; e: HLX.
图 1 qRT-PCR 定量检测的标准曲线以及融解曲线

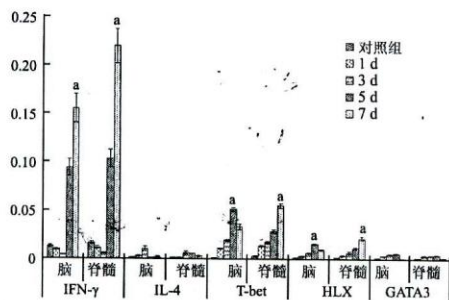
2.2 各组 IFN- γ 、IL-4、T-bet、HLX 和 Gata3 的 mRNA 表达量变化

定量测定结果显示在损伤组中, 脑组织中只有 IFN- γ 的表达显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其他因子的表达均无明显变化。而脊髓组织中 T-bet 和 HLX 的表达均呈明显增高趋势 ($P < 0.05$), 并且随时间推移, 增高趋势越明显 (图 2)。在 LPS 处理组中, 无论是脑组织来源还是脊髓组织来源, IFN- γ 、T-bet 和 HLX 的表达均较对照组显著增高 (图 3)。T-bet 和 HLX 在 LPS 处理组脊髓组织中增高的趋势比在损伤组的脊髓组织中更为明显, IFN- γ 增高的趋势类似 (图 4)。无论是脊髓损伤组还是 LPS 处理组, 细胞因子 IL-4 和转录因子 Gata3 均与对照组无明显差别, 呈低表达状态。由此可见, 脑脊髓损伤后呈现不同程度的 Th1 细胞相关因子上调, 尤以可溶性的细胞因子 IFN- γ 为著, 这可能与脑脊髓损伤时包括 Th1 细胞在内的 IFN- γ 产生或分泌系统活性增强有关, 其进一步作用将成为继发脑脊髓非感染性炎症损伤的始动因素。T-bet 与 HLX 表达的上调仅表现在脊髓损伤时, 提示损伤时可能有 Th1 细胞侵入受损脊髓, 从而稳固 Th1 极化状态。



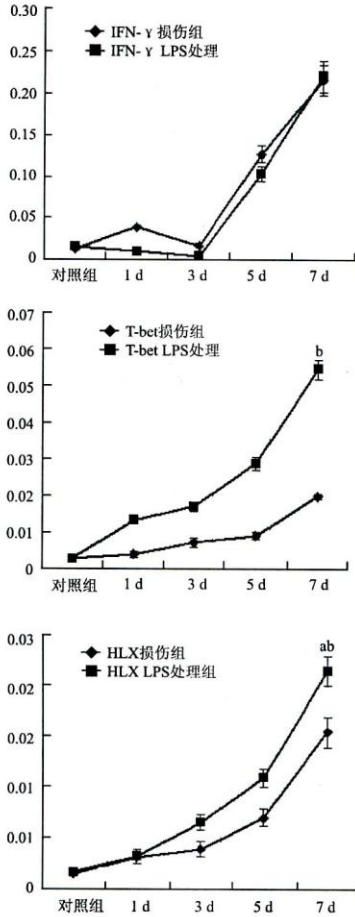
* $P < 0.05$ vs 对照组.

图 2 损伤组脑组织和脊髓组织中细胞因子表达



* $P < 0.05$ vs 对照组.

图 3 LPS 处理组脑组织和脊髓组织中细胞因子表达



*P < 0.05, ^bP < 0.01 vs 损伤组.

图4 IFN-γ、T-bet 和 HLX 在损伤组和 LPS 处理组脊髓组织中表达量变化比较

对损伤组和 LPS 处理组脊髓组织中均有显著变化的 T-bet/IFN-γ 和 HLX/IFN-γ 进行相关性分析, 结果表明 IFN-γ 与 T-bet 的 mRNA 表达具有明显相关性 ($r=0.702, P<0.01$), IFN-γ 与 HLX 的 mRNA 表达也呈现相关性 ($r=0.524, P<0.05$, 图 5)。

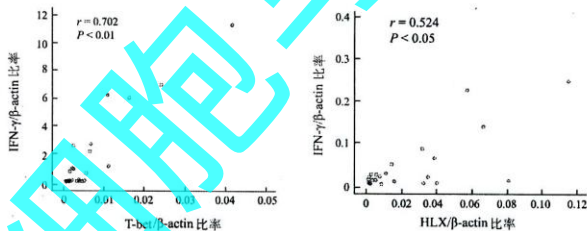


图5 IFN-γ、T-bet 和 HLX 基因表达的相关性

3 讨论

Th1/Th2 平衡在免疫应答的调节中起着关键的作用, 多种疾病的发生、发展和预后均涉及 Th1/Th2 分化失衡^[7-8], 而 Th1/Th2 的分化也受多种因素影

响, 其中转录因子 T-bet 的调节最为重要^[9-10]。缺乏 T-bet 的 CD4⁺ T 细胞不能分化成 Th1 谱系, 也不能发育成 Th2 谱系^[11]。令人惊奇的是, T-bet 还能将分化中的 Th2、效应性 Th2 及已完全分化的 Th2 逆转为 Th1^[12]。Lighvani 等^[13]和 Geanncarlo 等^[14]的研究进一步发现, T-bet 活化 IFN-γ 基因存在着一种自我调控, 即 T-bet 调控 IFN-γ 的表达, 而后者又可以逆向调控 T-bet 表达水平, 从而形成一种自我调控通路。T-bet 对于致脑炎 T 细胞是必要的, 在分析自发性脑、脊髓炎小鼠的 T-bet 水平时发现, 尽管这些细胞产生几乎很少的 IFN-γ, 但 T-bet 表达仍呈较高水平^[15-16]。提示 T-bet 可能还调节着与致脑炎相关的其他关键基因或途径。

我们以往的研究表明, 在某些自身免疫性疾病呈现典型的 Th1 漂移现象, Th2 类分子表达呈下降趋势。本研究结果显示, 在处理后的大鼠脑组织和脊髓组织中, T-bet、HLX 与 IFN-γ 的表达水平明显高于正常对照组, 提示 IFN-γ 的表达水平与大鼠脑损伤的程度有着密切关系。通过相关性分析表明, 脊髓损伤后脊髓中 T-bet、HLX 与 IFN-γ 的表达存在高度相关性, 提示 IFN-γ 作为 Th1 细胞特异性细胞因子, 在脊髓损伤过程中发挥重要作用, 同时也提示在脊髓损伤时可能有 T 细胞的侵入, 并在 T-bet 和 HLx 的共同作用下维持着 Th1 细胞优势状态和高 IFN-γ 表达水平, 对脊髓二次免疫炎症性损伤起着推波助澜的作用。然而在损伤的脑组织, 尽管 IFN-γ 的表达升高, 但转录因子 T-bet、HLX 和 GATA3 的表达却没有明显改变, 推测 Th1 细胞及其他来源的 IFN-γ 可释入受损脑组织, 而存在于 Th1 或 Th2 细胞内的核转录因子 T-bet 或 GATA3 则可能因 T 细胞未能侵入脑组织而呈低水平表达。

由此可见, 脑脊髓损伤作为一种内源性的危险信号, 其可诱发次生的免疫炎症而介导脑脊髓二次损伤或改变损伤类型。高表达于受损脑脊髓的 IFN-γ, 可能是这种次生非感染性损伤的始动因素, 侵入受损脊髓的 Th1 细胞可通过 T-bet 表达水平的增强而稳定脊髓局部 Th1 极化状态, 损伤的脑组织也可因患者机体 Th1 细胞极化产生的高水平 IFN-γ, 使脑脊髓损伤在免疫机制下进一步加重。适时调整这种免疫失衡的状态也许有助于此类疾病的控制。

(下转 926 页)

- [6] 孙大庆, 杨锡强, 刘 玮, 等. 卵清蛋白雾化吸入诱导肠道菌群失调小鼠肺部过敏反应的发生[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(3): 281-284.
- [7] 孙大庆, 杨锡强, 王莉佳, 等. 卵清蛋白激发对肠道菌群失调小鼠 T 细胞功能亚群的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(5): 473-476.
- [8] Küttüksezer UC, Palomares O, Rückert B, et al. Triggering of specific Toll-like receptors and proinflammatory cytokines breaks allergen-specific T-cell tolerance in human tonsils and peripheral blood[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(3): 875-885.
- [9] Kubo T, Hatton RD, Oliver J, et al. Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2004, 173(12): 7249-7258.
- [10] Moon HG, Kang CS, Choi JP, et al. Acetyl salicylic acid inhibits Th17 airway inflammation *via* blockade of IL-6 and IL-17 positive feedback[J/OA]. *Exp Mol Med*, 2013, 45: e6.
- [11] Al-Muhsen S, Letuve S, Vazquez-Tello A, et al. Th17 cytokines induce pro-fibrotic cytokines release from human eosinophils[J/OA]. *Respir Res*, 2013, 14: 34.
- [12] Halwani R, Al-Muhsen S, Hamid Q. T helper 17 cells in airway diseases: from laboratory bench to bedside[J]. *Chest*, 2013, 143(2): 494-501.
- [13] Neveu WA, Allard JB, Dienz O, et al. IL-6 is required for airway mucus production induced by inhaled fungal allergens[J]. *J Immunol*, 2009, 183(3): 1732-1738.

(上接 922 页)

参考文献:

- [1] Zen M, Ghirardello A, Iaccarino L, et al. Hormones, immune response, and pregnancy in healthy women and SLE patients[J]. *Swiss Med Wkly*, 2010, 140(13-14): 187-201.
- [2] Gu W, Li C, Yin W, et al. Effects of Shen-Fu injection on the expression of t-cell-specific transcription factors T-bet/Gata-3 in porcine postresuscitation lung injury [J/OA]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 464650.
- [3] Gu B, Zeng Y, Yin C, et al. Sinomenine reduces iNOS expression *via* inhibiting the T-bet IFN- γ pathway in experimental autoimmune encephalomyelitis in rats[J]. *J Biomed Res*, 2012, 26(6): 448-455.
- [4] Morita M, Watanabe M, Inoue N, et al. Functional polymorphisms in TBX21 and HLX are associated with development and prognosis of Graves' disease[J]. *Autoimmunity*, 2012, 45(2): 129-136.
- [5] Xu Y, Gao J, Su Z, et al. Downregulation of Hlx closely related to the decreased expressions of T-bet and Runx3 in patients with gastric cancer may be associated with a pathological event leading to the imbalance of Th1/Th2[J/OA]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 949821.
- [6] Ousman SS, Kubes P. Immune surveillance in the central nervous system[J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15(8): 1096-1101.
- [7] 李良清, 梁庆威, 朱 悦, 等. C9 和 CD59 在大鼠脊髓损伤组织中的表达[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(15): 4890-4892.
- [8] 李雅贞, 王胜军, 石 燕, 等. 人外周血 CD8⁺T 细胞 Runx3 的基因克隆及其原核表达[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(2): 107-110.
- [9] 杨 敏, 王颖英, 王胜军, 等. 人 T-bet 基因的克隆及序列分析[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2006, 16(2): 109-111.
- [10] Chakir H, Wang H, Lefebvre DE, et al. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3[J]. *J Immunol Methods*, 2003, 278(1-2): 157-169.
- [11] Ji N, Sosa RA, Forsthuber TG. More than just a T-box: the role of T-bet as a possible biomarker and therapeutic target in autoimmune diseases[J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(3): 435-441.
- [12] Tominaga N, Ohkusu-Tsukada K, Udono H, et al. Development of Th1 and not Th2 immune responses in mice lacking IFN-regulatory factor-4[J]. *Int Immunol*, 2003, 15(1): 1-10.
- [13] Weigmann B, Neurath MF. T-bet as a possible therapeutic target in autoimmune disease[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2002, 6(6): 619-622.
- [14] Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(26): 15137-15142.
- [15] Lugo-Villarino G, Maldonado-Lopez R, Possemato R, et al. T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(13): 7749-7754.
- [16] Yang Y, Jeffrey Weiner, Liu Y, et al. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells[J]. *J Exp Med*, 2009, 206(7): 1549-1564.