

PSGL-1 基因敲除小鼠血中 MIP-1 γ 和 TNF- α 的表达

李江超, 周泽启, 叶 杰, 韩 露, 叶宇翔, 刘 影,
何晓东, 陈 卉, 袁俏冰, 黎 帅, 张静丽, 王丽京

(广东药学院 血管生物学研究所, 广东 广州 510006)

【摘要】 目的 研究 PSGL-1 缺失对遗传基因工程小鼠外周血血常规的影响, 并检测外周血中炎症因子 IGFBP-6、TNF- α 和 MIP-1 γ mRNA 表达水平。方法 用血常规检测方法检测正常 C57/BL/6 小鼠和 PSGL-1 基因缺失的基因工程小鼠 (PSGL-1^{-/-} 小鼠) 的外周血中血常规的差异; 其次, 提取两种鼠的血液的 mRNA, 逆转录为 cDNA, 采用 real-time PCR 方法, 检测 C57 小鼠与 PSGL-1^{-/-} 小鼠外周血中炎症因子 TNF- α 和 MIP-1 γ mRNA 的差异。结果 与对照组 C57 小鼠相比, PSGL-1^{-/-} 基因工程小鼠在 12 周龄时外周血中中性粒细胞 (* $P < 0.05$)、淋巴细胞 (** $P < 0.01$) 和白细胞细胞 (***) 总数显著增加炎症因子 TNF- α 以及 MIP-1 γ 表达增加 ($P < 0.05$)。结论 PSGL-1 的缺失改变了小鼠细胞因子并影响了外周血的血细胞组成, MIP-1 γ 和 TNF- α 炎症因子上调, 有可能影响了小鼠的免疫功能。

【关键词】 PSGL-1; TNF- α ; MIP-1 γ ; 基因工程动物

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 02-0070-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.002.015

Expression of MIP-1 γ and TNF- α in PSGL-1 knockout mice

LI Jiang-chao, ZHOU Ze-qi, YE Jie, HAN Lu, YE Yu-xiang, LIU Ying, HE Xiao-dong,

CHEN Hui, YUAN Qiao-bing, LI Shuai, ZHANG Jing-li, WANG Li-jing

(Institute of Vascular Biology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of loss of PSGL-1 on routine blood test results in PSGL-1 knockout (PSGL-1^{-/-}) mice, and to detect the expression levels of cytokines IGFBP-6, TNF- α and MIP-1 γ mRNA in their peripheral blood. **Methods** To detect the differences in routine blood test results of normal C57/BL/6 mice and PSGL-1^{-/-} mice. To prepare cDNA from isolated blood mRNA, and to analyze the differences in expression of cytokines TNF- α and MIP-1 γ mRNA in peripheral blood of the C57 mice (control) and PSGL-1^{-/-} mice by real-time PCR. **Results** Compared with the C57 control mice, the 12-week old PSGL-1^{-/-} mice showed significantly increased neutrophils ($P < 0.05$), lymphocytes ($P < 0.01$) and total leukocyte counts ($P < 0.001$), and increased expression levels of TNF- α and MIP-1 γ mRNA in the peripheral blood ($P < 0.05$). **Conclusions** Our findings suggest that the loss of PSGL-1 changes the cell counts of peripheral blood in mice. The up-regulation of cytokines MIP-1 γ and TNF- α may influence the immune function of the mice.

【Key words】 PSGL-1; TNF- α ; MIP-1 γ ; Transgenic mice; Peripheral blood

[基金项目] 国家自然科学基金(31271455) 广东省医学科研基金(A2013312)。

[作者简介] 李江超, 男, 博士。E-mail: lijiaochao@gdpu.edu.cn。

[通讯作者] 王丽京(1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤分子生物学。E-mail: wanglijing62@163.com。

P-选凝素糖蛋白配体 1 (P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1) 是 20 世纪 90 年代初期发现的一种黏附分子,具有同源二聚体结构的跨膜糖蛋白,表达于白细胞的膜表面。PSGL-1 是 P-选凝素的配体,同时也是 L-选凝素和 E-选凝素的配体,研究表明其在炎症反应中发挥重要作用。在炎症环境中,PSGL-1 与 P-选凝素的相互作用在白细胞黏附的起始阶段发挥重要作用,促进白细胞与内皮细胞的紧密连接和穿越血管壁到炎症部位^[1]。PSGL-1 在介导白细胞黏附的同时,也可以作为信号分子转导胞外信号,促进白细胞活化并使其稳定黏附^[2]。另外研究表明 PSGL-1 对 T 细胞归巢有着显著影响,从而影响 T 细胞的发育^[3]。而最近的报道,PSGL-1 表达在转移的前列腺癌细胞上,所以其分子机制和功能有待进一步研究^[4]。

遗传基因工程小鼠模型是生命科学研究手段中具人类疾病模拟性的实验模型之一,小鼠是哺乳类实验动物,具有体型小,繁殖力强,饲养成本低,能较好模拟人体等多种优点,所以我们采用 PSGL-1 敲除的基因工程小鼠,在动物水平验证了 PSGL-1 对免疫功能得影响,比细胞水平有着显著优势。因为细胞水平无法模拟免疫学的改变。利用基因工程小鼠建立各种肿瘤模型是当今肿瘤学研究的新趋势。基因敲除小鼠模型在肿瘤学研究上具有其它模型无法比拟的优势:在不伴有药物副作用的条件下,基因产物的作用被完全消除^[5-6]。

在本研究中,为了进一步了解 PSGL-1 的作用和功能,我们采用 PSGL-1 基因工程敲除小鼠,进一步在动物体内了解 PSGL-1 缺失后对免疫细胞和炎症因子的影响。结果发现,PSGL-1 敲除后,小鼠的血常规发生改变,重要的炎症因子 TNF- α 和趋化因子 MIP-1 γ 显著上升。这些实验结果为进一步研究 PSGL-1 如何在机体内介导炎症从而发挥作用有着重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

PSGL-1^{-/-}小鼠(B6. Cg-Selplgtm^{1Fur}/J)购买自美国 Jackson 实验室,SPF 环境中饲养扩群。蛋白酶 K 及 dNTP 等 PCR 体系为 Sigma 公司产品,Trizol 购自 Invitrogen,PCR 引物由 Invitrogen 公司合成,Taq 酶、Tris 饱和酚及氯仿、异丙醇为广州康龙公司产品。

1.2 方法

1.2.1 建系及扩群: PSGL-1^{+/-}与同笼 PSGL-1^{+/-}小鼠杂交,得到的子代有三种情况 PSGL-1^{+/-}、PSGL-1^{+/+}、PSGL-1^{-/-},经鉴定后得到 PSGL-1^{-/-}即目的实验的小鼠,PSGL-1^{+/+}即为正常小鼠(C57 小鼠),作为对照,PSGL-1^{+/-}用来繁殖和配种。

1.2.2 PSGL-1^{-/-}基因工程小鼠鉴定: PSGL-1^{-/-}小鼠鉴定引物序列为:野生型:P1:5'-AGC TTC CTT GTG CTG CTG AC-3'; P2:5'-TCA AAA TCG TCA TCC CCA AC-3',扩增条带为 140 bp; PSGL-1 基因突变型:P1:5'-TCA AAA TCG TCA TCC CCA AC-3'; P2:5'-CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG-3',扩增条带为 500 bp。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min, 94℃/30 s、65℃/1 min、72℃/1 min,35 个循环;72℃ 延伸 2 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 结果,紫外灯下观察结果并拍照。

1.2.3 外周血血常规的检测:取同批周龄大小的 C₅₇、PSGL-1^{-/-}小鼠(11 周,雌雄比例均衡),每组 4 只,眼眶取血,检测外周血中变化情况,采用临床血常规仪器计数各类细胞的百分比和绝对值。

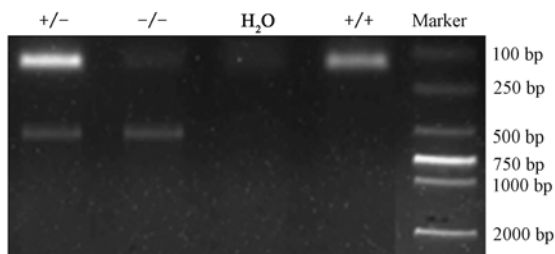
1.2.4 荧光定量 PCR:对上述分组小鼠,眼眶取血法取 C₅₇、PSGL-1^{-/-},500 μ L 血中加入 1 mL Trizol, 12 000 r/min,4℃ 离心 10 min;吸取上清液至一新的 EP 管中,静置 5 min,使之充分裂解;加入 200 μ L 氯仿,剧烈震荡 15 s,然后放置 3 min;13 400 r/min, 4℃ 离心 15 min,离完后分为 3 层,取最上层(中间一层为蛋白)至一新的 EP 管中,加入等体积异丙醇,颠倒数次,室温沉淀 10 min;13 400 r/min,4℃ 离心 10 min,弃上清液;加入 75% 乙醇(DEPC 水溶解),颠倒数次混匀;8 300 r/min,4℃ 5 min,弃上清液,小心吸尽液体(此时可以看到白色沉淀即为 RNA);RNA 略干后加入 20 μ L DEPC 水。用 TaKaRa 公司的逆转录试剂盒逆转录成 cDNA,用得到 cDNA 进行 real-time PCR,(Tiangen kit 货号 FP205)95℃ 预变性 15 min,94℃/10 min、60℃/32 s,反应 40 个循环,融解曲线分析引物特异性,Ct 值标准化后计算相对拷贝数。

2 结果

2.1 PSGL-1 基因繁殖和鉴定

根据 PCR 后电泳条带结果,可以区分出条带为 500 bp 的为 PSGL-1 基因突变的小鼠,即 PSGL-1^{-/-}小鼠,如图 1 第二泳道(从左向右)即是;PCR 扩增

条带为 500 bp 和 140 bp 为杂合子 PSGL-1^{+/-}, 图 1 中第一泳道即是, 野生型 PCR 扩增产物条带为 140 bp。其中长度约 500 bp 的条带为 PSGL-1 基因突变的小鼠特有的条带; 140 bp 的条带为正常小鼠以及 PSGL-1 基因突变的杂合小鼠都应该具有的条带。



注: Marker; DNA marker 2000。

图 1 鉴别 PSGL-1 缺失的基因小鼠

Note: Marker; DNA marker 2000.

Fig. 1 Identification of the PSGL-1^{-/-} mice

2.2 PSGL-1 基因工程小鼠中外周血常规异常

取 C57 小鼠和 PSGL-1^{-/-} 小鼠的外周血进行血常规检验, 与正常小鼠对比, 结果发现 PSGL-1^{-/-} 外

周血中中性粒细胞 ($P < 0.05$)、淋巴细胞 ($P < 0.01$) 和白细胞总数显著增加 ($P < 0.001$) (图 2), 在本实验中 BASO 为嗜碱细胞绝对值、EO 为嗜酸细胞绝对值、LYMPH 为淋巴细胞绝对值、MONO 为单核细胞绝对值、NEUT 为分叶细胞 (中性粒细胞) 绝对值、WBC 为白细胞绝对值。嗜酸性细胞和单核细胞数量的绝对值有差异趋势, 但是没有统计意义 ($P > 0.05$) (图 2)。

2.3 MIP-1 γ 和 IGFBP-6 mRNA 水平显著上调

上述结果提示淋巴细胞等细胞数量绝对值增加, TNF- α 是重要的炎症因子, 而 IGFBP-6 和 MIP-1 γ 在我们以前的蛋白芯片结果提示上调, 而这些炎症因子对淋巴细胞和中性粒细胞以及碱性淋巴细胞调节有着重要意义, 所以我们对 IGFBP-6, MIP-1 γ 和 TNF α mRNA 水平进行检测。提取两种鼠的血液得到总 mRNA, 获得 cDNA, 进行 real-time PCR 检测, 结果如图所示 (图 3) 小鼠血液中 IGFBP-6、TNF- α 、MIP-1 γ 均以 GAPDH 为内参, 结果显示 TNF- α ($P < 0.01$)、MIP-1 γ 升高 ($P < 0.05$) (图 3)。

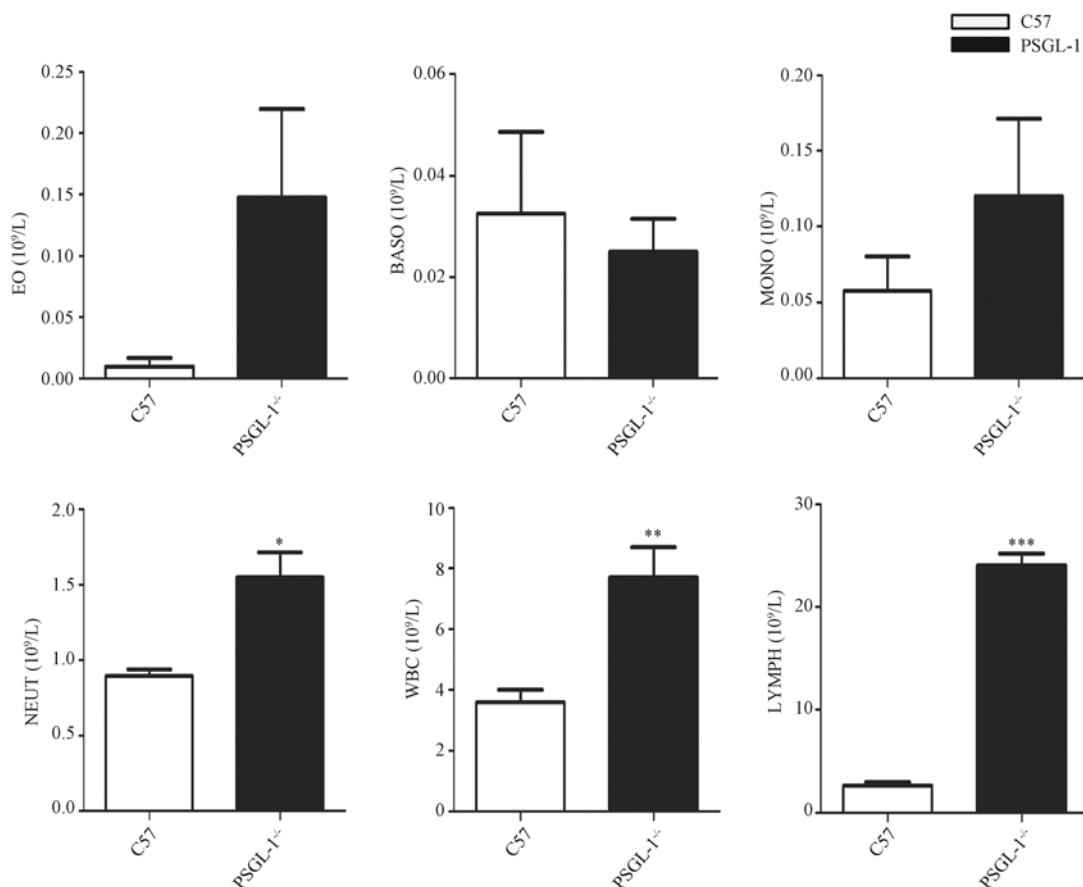


图 2 PSGL-1 基因工程小鼠中外周血中血细胞变化情况

Fig. 2 Changes of blood cell counts in peripheral blood of the PSGL-1 knockout mice

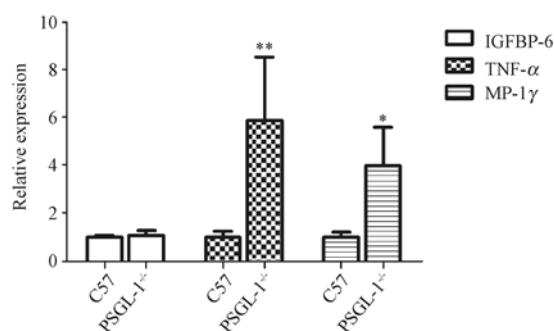


图3 相关炎症细胞因子的检测

Fig. 3 The relative expression of cytokine factors in peripheral blood

3 讨论

PSGL-1 主要表达在白细胞上,其配基是 P-selectin、L-selectin 及 E-selectin,它是一种 I 型跨膜糖蛋白^[7]。介导白细胞在内皮上粘附、聚集及活化并释放炎症递质,参与炎症过程,也存在白细胞粘附、活化的反馈机制^[8-10]。静息的血小板和内皮细胞很少表达 P-选择素,在凝血酶、组胺、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素 1 β (interferon-1 β , IL-1 β)、脂多糖 (lipopolysacchride, LPS)、氧自由基、补体 C5a、高血糖等刺激下,发生脱颗粒反应,颗粒膜与细胞膜迅速融合,可使已储存的 P-选择素于数分钟内在细胞表面表达,从而介导白细胞的俘获,顺血流方向沿内皮细胞表面向损伤部位滚动,这是白细胞牢固粘附和移行外渗的最初亦是最关键的阶段。另外,PSGL-1 还可能与胸腺的内皮细胞结合,影响 T 细胞的定位和 T 细胞在胸腺内的发育。最近的报道,一些白血病肿瘤细胞表达 PSGL-1,而且最近报道 PSGL-1 表达在肿瘤细胞有助于前列腺癌的转移。

我们的研究提示 PSGL-1 缺失后,影响了外周血的改变,淋巴细胞和中性粒细胞等增加,我们推测可能 PSGL-1 影响了白细胞的发育或者影响了白细胞的迁移,其不能趋化到其他器官,导致血液中白细胞增加,另外,我们还检测到 CD3 下调(未展示),而外周血中总淋巴细胞是显著升高的,淋巴细胞还包括 NK 细胞, B 淋巴细胞等,另外,血常规仪原理是根据血细胞非传导的性质和引起的电阻变化进行检测为基础所进行血细胞计数和体积测定。而流式细胞的检测原理基于正电或负电的液滴通过高压偏转板时发生向阴极或向阳极的偏转,从而达到了分类收集细胞的目的。

进一步的 mRNA 水平检测,也证实 PSGL-1 缺失的基因工程小鼠中 MIP-1 γ 的变化和 TNF α 表达发生改变,而 NCBI 生物信息学提示 MIP-1 γ 主要表达在髓细胞和单核细胞,从外周血中的变化(图 2)也证实了 PSGL-1 可能影响了髓细胞的分化或其它信号通路,大量研究的证明 PSGL-1 影响了炎症的发生和免疫的稳态调控^[1]。但是 PSGL-1 如何影响 MIP-1 γ 的变化还不是很清楚,需要我们更进一步的探索。

肿瘤坏死因子- α 最初发现抑制肿瘤的生长以及可以诱导小鼠内皮细胞 P 选凝素的表达,是一种涉及到系统性炎症的细胞因子。主要由巨噬细胞分泌,其它类型的细胞也能产生。肿瘤坏死因子 α 的主要作用是调节免疫细胞的功能。作为一种内源性致热原,它能够促使发热,引起细胞凋亡,通过诱导产生 IL-1 和 IL-6,引发炎症,或阻止肿瘤发生和病毒复制。但是,当机体中 TNF- α 超过一定量时,TNF- α 与其他多种炎症因子一起,反而能促进癌症的发生发展及产生多种病理性损伤^[11-14]。而本研究结果证实 PSGL-1 的缺失会使 TNF- α 升高,文献报道,Wnt 途径参与白细胞在炎症中的反应,如调节单核细胞向内皮细胞的迁移作用^[15]。上述结果提示 PSGL-1 的缺失可能与炎症的发生和发展有关系。

综上所述,PSGL-1 作为白细胞上的膜蛋白,参与白细胞的活化、胞内信号转导,从而参与了炎症的形成和发展。我们以前发现 PSGL-1 缺失的肠道肿瘤恶化加剧,其 PSGL-1 通过炎症促进肿瘤发展的机制有待深入研究。

参考文献:

- [1] Carlow DA, Gossens K, Naus S, et al. PSGL-1 function in immunity and steady state homeostasis [J]. Immunol Rev, 2009, 230(1):75-96.
- [2] Wang HB, Wang JT, Zhang L, et al. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation [J]. Nat Immunol, 2007, 8(8):882-92.
- [3] Sultana DA, Zhang SL, Todd SP, et al. Expression of functional P-selectin glycoprotein ligand 1 on hematopoietic progenitors is developmentally regulated [J]. J Immunol, 2012, 188(9):4385-4393.
- [4] Dimitroff CJ, Descheny L, Trujillo N, et al. Identification of Leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells [J]. Cancer Res, 2005, 65(13):5750-5760.

(下转第 78 页)

进实验方法对该方法进行了稳定性实验和线性关系考察均取得了良好的效果。小鼠胸骨剑突以下解剖部位主要包括胃、肠等腹腔脏器组织,因此为了能够准确的测量小鼠腹腔水液测量体积的变化,我们选择小鼠胸骨剑突部位作为测量点,该研究采用腹腔注射苯甲酸雌二醇注射液建立肾虚模型,并在相同的时间点腹腔注射 1 mL 的生理盐水造成水负荷,连续造模 15 d,造成小鼠脏腑功能失调,水液代谢异常,肾虚模型小鼠因动物消瘦、体质羸弱,其体重和腹腔水液测量体积在整体上表现出下降的趋势(这也能排除因动物皮下脂肪、肠道内容物等增多会造成腹腔水液测量体积的增高,而出现假阳性现象),但腹水指数却显著性升高,与正常对照组比较差异有显著性($P < 0.05$),该测量方法简单易行、容易操作,可以快速的测量出小鼠的腹水指数,为以腹水为指征的相关中医证候模型的评价提供借鉴和参考,为中医证候模型的客观化评价提供量化的数据支持。

济南益延科技发展有限公司李云峰老师对本实验提出的宝贵意见,在此表示感谢!

参考文献:

- [1] 孙文江,石君华. 真武汤治疗阳虚型肾病综合征水肿临床观察[J]. 湖北中医杂志, 2009, 31(6):46-47.
- [2] 姜群生. 经方治疗肾系水肿病的研究与分析[D]. 北京,中国中医科学院, 2010.
- [3] 陈素红,吕圭源,范景,等. 海马不同提取物对雌二醇致肾虚小鼠的影响[J]. 中草药, 2009, 40(2):258-262.
- [4] 张萍,任永申,付强,等. 软肝消水巴布剂对 S180 腹水模型小鼠的治疗作用[J]. 解放军药学报, 2007, 23(4):259-262.
- [5] 宋维才,侯桂民. 阿基米德原理的内涵[J]. 唐山师专学报, 2000, 22(2):50-51.
- [6] 李静,杨勇,尹翠翠,等. 肾虚小鼠模型呼吸代谢转换率、产热量的实验研究[J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(2):148-151.
- [7] 李霞. 加味柴苓汤联合顺铂、白介素-2 腹腔内注射治疗肝癌腹水的临床研究[D]. 南京,南京中医药大学.
- [8] 韩凯. 中西医结合治疗脾肾阳虚型腹水疗效观察[J]. 中医学报, 2012, 27(10):1369-1370.
- [9] 王钰霞,陈魁敏,郝伟. 真武汤对阳虚小鼠作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(1):48-49.

[修回日期]2013-12-11

(上接第 73 页)

- [5] Blake JA, Richardson JE, Bult CJ, et al. MGD: the Mouse Genome Database [J]. Nucl Acids Res, 2003, 31(1):193-195.
- [6] Bult CJ, Blake JA, Richardson JE, et al. The Mouse Genome Database (MGD): integrating biology with the genome [J]. Nucl Acids Res, 2004, 32:D476-D481.
- [7] Raes G, Ghassabeh GH, Brys L, et al. The metastatic T-cell hybridoma antigen/P-selectin glycoprotein ligand 1 is required for hematogenous metastasis of lymphomas [J]. Int J Cancer, 2007, 121(12):2646-2652.
- [8] Goda MA, Tanaka T, Monden M, et al. Characterization of an apparently conserved epitope in E- and P-selectin identified by dual-specific monoclonal antibodies. Eur J Immunol, 1999, 29:1551-1560.
- [9] Vadas MA, Harlan J. The selection [M]. New York, Harward, 1997: 1.
- [10] Gout S, Huot J. Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer [J]. Cancer Microenviron, 2008, 1(1):69-83.
- [11] Roy Fleischmann R, Yocum D. Does safety make a difference in selecting the right TNF antagonist [J]. Arthritis Res Ther. 2004; 6(Suppl 2): S12-S18.
- [12] Egberts JH, Cloosters V, Noack A, et al. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis [J]. Cancer Res, 2008, 68(5):1443-50.
- [13] Stathopoulos GT, Kollintza A, Moschos C, et al. Tumor necrosis factor- α promotes malignant pleural effusion [J]. Cancer Res, 2007, 67(20):9825-34.
- [14] Scott KA, Moore RJ, Arnott CH, et al. An anti-tumor necrosis factor- α antibody inhibits the development of experimental skin tumors [J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(5):445-451.
- [15] Lara T, Joachim S, Anke S, et al. Wnt signaling regulates transendothelial migration of monocytes [J]. J Leuk Biol. 2006, 79:1306-1313.

[修回日期]2013-12-11