

· 基础研究 ·

小鼠脏器核转录因子 NF- κ B 活性观察

鲍国强 李素波 张永祥 章扬培 王士雯

【摘要】 目的 为了研究核转录因子(NF- κ B)在老化小鼠各脏器中的表达及其活性的改变,以期探讨其在老化及多器官功能不全发生过程中的作用。方法 用免疫组化法检测 NF- κ B 在小鼠各脏器中的表达情况,同时用凝胶阻滞分析法观察 NF- κ B 的活性。结果 在老化小鼠的各脏器中,NF- κ B 的表达量及活性均有不同程度的增加,尤以肺脏的改变最为显著。结论 NF- κ B 可能是老化及肺启动的老年多器官功能不全过程中的一个非常关键的转录因子。

【关键词】 核转录因子- κ B;细胞衰老;多器官功能衰竭

NF- κ B activity in aged mouse organsBAO Guoqiang¹, LI Subo¹, ZHANG Yongxiang², ZHANG Yangpei¹, WANG Shiwen³

1. Institute of Transfusion, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

3. Institute of Geriatric Cardiology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective The nuclear factor κ B (NF- κ B) is a ubiquitous transcription factor in mammalian cells. It was reported that NF- κ B regulated the expression of genes responsible for multiple biological processes including immune responses, inflammatory reaction, cell proliferation and apoptosis. The current study was to examine changes in the expression and activity of the NF- κ B in the aged mouse organs in order to study the role of NF- κ B in ageing and multiple organ dysfunction syndrome in the elderly (MODSE). Methods The expression and activity of NF- κ B in aged mouse organs were examined with immunohistochemistry and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) respectively. Results The expression and DNA binding activity of NF- κ B increased remarkably in organs of aged mice, especially in the lung. Conclusions NF- κ B may be an important transcription factor in ageing processes and MODSE.

【Key words】 Nuclear factor- κ B (NF- κ B); Cell ageing; Multiple organ failure

核转录因子(nuclear factor κ B, NF- κ B)是广泛存在于哺乳动物细胞中的转录因子,以其为核心的信号转导系统是目前真核细胞基因表达调控研究的热点之一。它涉及机体的免疫反应、急性炎症反应、细胞粘附、细胞生长分化、氧化还原代谢、肿瘤发生

及细胞凋亡等多种重要的病理、生理过程。近年来,许多学者研究发现在衰老过程中,心^[1]、肝^[2]、脑^[3]等器官均出现 NF- κ B 的激活的现象,提示 NF- κ B 信号转导系统在机体老化过程中起重要作用。

王士雯等^[4]根据多年的临床观察提出了老年多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome in the elderly, MODSE)的肺启动机制假说,指出肺脏在 MODSE 及多器官衰竭过程中起先导作用。为了研究 NF- κ B 与衰老的关系及验证肺衰老在 MODSE 中的作用,本研究以自然衰老的小鼠为对象,检测了 NF- κ B 在小鼠各个脏器中的表达水平,为阐明器官衰老的分子机理,寻求保护器官衰竭的有效措施提供依据。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(编号 G2000057004)

作者单位:100850 北京,军事医学科学院野战输血研究所(鲍国强,李素波,章扬培);100850 北京,军事医学科学院毒物药物研究所(张永祥);100853 北京,中国人民解放军总医院老年心血管病研究所(王士雯)

作者简介:鲍国强,男,在读医学博士研究生

通讯作者:章扬培,电话:010-66930920; E-mail: zhangyp@nic.bmi.ac.cn

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物:NIH 品系自然老化小鼠(16 月龄)及对照年轻小鼠(2 月龄)各 10 只,购自解放军总医院小动物中心。SAM-P8(促衰老型)小鼠(14 月龄和 1.5 月龄)各 10 只由军事医学科学院毒物药物研究所张永祥教授提供。试剂: P^{65} 抗体购自 Merck 公司。二抗购自华美生物工程公司。蛋白浓度测定试剂盒购自 Pierce 公司。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒购自南京建成生物制品研究所。 γ - 32 P ATP 购自亚辉公司。寡聚核苷酸由大连宝生物工程公司合成。仪器:分光光度计为 Beckman DU 640 型。图像分析软件:北京航空航天大学医学图像分析系统。

1.2 方法

1.2.1 石蜡切片的制作 取各组小鼠的脏器(心脏、肝脏和肺脏),按常规石蜡切片制作方法制作^[5]。

1.2.2 NF- κ B 的免疫组化分析^[5] 基本步骤如下:

① 切片脱蜡:将石蜡切片浸入二甲苯中 5min,然后转入另一装有二甲苯的容器中,继续脱蜡 5min。② 切片的水化:取出切片按顺序置于浓度为 100%、95%、85%、75%、70% 的乙醇溶液中,各 3min,最后放入水中。③ 微波修复切片:将切片放入抗原修复液中,在微波炉中修复 10min。取出冷却到室温。④ 利用 H_2O_2 灭活内源性辣根过氧化物酶(HRP)。⑤ 封闭非特异性抗原→加 P^{65} 的抗体,37℃ 反应 60min→洗涤→加与生物素偶连的通用二抗,37℃ 反应 30min→洗涤→加与亲和素偶连的 HRP,37℃ 反应 30min→洗涤→加显色底物二甲基联苯胺(DAB),室温反应 5min→核复染→封片。⑥ 切片经扫描后使用北京航空航天大学医学图像分析系统分析。

1.2.3 组织匀浆 取小鼠的脏器,置于冰浴的生理盐水(生理盐水的量为脏器质量的 9 倍)中剪碎,倒入玻璃匀浆器中进行匀浆,左手持匀浆管将下端插入盛有冰水混合物的器皿中,右手将捣杆垂直插入套管中,上下转动研磨数十次(约 10min),充分研碎,使组织匀浆化。

1.2.4 组织蛋白浓度的测定 按试剂盒内说明书进行。

1.2.5 SOD 及 MDA 水平测定 按试剂盒说明书进行。SOD 活性单位(每毫克组织蛋白在 1ml 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个亚

硝酸盐单位)及 MDA 的含量(μ mol/g 蛋白)按说明书方法计算。

1.2.6 组织核蛋白的提取 取各脏器组织块置于 10 倍体积的冰上预冷的匀浆缓冲液(0.25mol/L 蔗糖,15mmol/L Tris-Cl, pH 7.9, 60mmol/L KCl, 15mmol/L NaCl, 5mmol/L EDTA, 0.1mmol/L PMSF, 2mg/L 胃蛋白酶抑制素 A, 0.15mmol/L 精胺)中,在冰上匀浆 10min。4℃ 下 $2000 \times g$ 离心 10min,沉淀重悬于洗液(10mmol/L HEPES, pH 7.9, 1.5mmol/L $MgCl_2$, 10mmol/L KCl, 1mmol/L 巯基乙醇, 0.1mmol/L PMSF, 2mg/L 胃蛋白酶抑制素 A)中,室温下 $4000 \times g$ 离心 5min,核沉淀再溶于 50 μ l 高盐核裂解液(500mmol/L HEPES, pH 7.9, 0.75mmol/L $MgCl_2$, 0.5mol/L KCl, 12.5% 甘油, 1mmol/L 巯基乙醇, 0.1mmol/L PMSF, 2mg/L 胃蛋白酶抑制素 A)中,在冰上裂解 30min,期间温和震荡。4℃ 下 $14000 \times g$ 离心 10min,收集上清,分装成小份冷存于 -80℃ 冰柜中。

1.2.7 凝胶阻滞分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA) ① 按参考文献[6]合成探针序列:

+ 5' - AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C - 3'
3' - TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G - 3';

② 标记寡核苷酸。取寡核苷酸(2 μ mol/L)2 μ l,与 5 μ l 的 γ - 32 P ATP(111PBq/mol)混合,用 T4 多聚核苷酸激酶(polynucleotide Kinase)进行标记,反应体系为 20 μ l,在 37℃ 下反应 10min。

③ 取 4 μ g 细胞核蛋白与标记好的探针进行温浴,条件为室温,20min。

④ 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,缓冲液为 0.5 $\times$ 的 TBE,300V,10min。

⑤ 放射自显影。取下凝胶,用保鲜膜包裹,覆盖两张 X 线片,两侧加增感屏,放置于暗盒中于 -70℃ 自显影 2d。

2 结果

2.1 小鼠脏器内的氧化水平 为了衡量老化小鼠体内的氧化水平,作者测定了小鼠各脏器的 SOD 活性和 MDA 的含量,SOD 活性表明动物机体清除氧化自由基的能力,MDA 的含量则表明了动物机体内的氧化水平。

2.1.1 SOD 活性水平 由表 1 可知,SOD 活性在老化小鼠和年轻小鼠的心脏、肝脏和肺脏之间有显著性差异($P < 0.01$)。老化小鼠心脏、肝脏和肺脏中 SOD 活性较年轻小鼠的脏器分别降低 12.7%,

18.0%, 37.2%, 说明老化小鼠体内的清除自由基的能力下降。另外, 值得注意的是 SOD 活力在肺脏中下降的幅度最大, 高达 37.2%, 提示小鼠在衰老过程中肺脏细胞清除自由基能力减弱最强, 对肺脏的威胁最大。

表 1 老化及年轻小鼠各脏器中 SOD 活性
($\bar{x} \pm s$, 亚硝酸盐 kU/g 蛋白)

组别	心脏	肝脏	肺脏
老化小鼠	408.6 $\pm$ 45.3	395.7 $\pm$ 40.6	130.5 $\pm$ 15.8
年轻小鼠	469.5 $\pm$ 39.2	482.6 $\pm$ 35.2	207.5 $\pm$ 26.3

注: $P < 0.01$, $n = 20$, 有显著性差异

2.1.2 MDA 含量 见表 2。

表 2 老化及年轻小鼠各脏器中 MDA 的含量
($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/g}$ 蛋白)

组别	心脏	肝脏	肺脏
老化小鼠	6.26 $\pm$ 1.27	10.77 $\pm$ 2.13	12.25 $\pm$ 2.54
年轻小鼠	5.57 $\pm$ 1.02	9.14 $\pm$ 2.01	10.57 $\pm$ 1.89

注: $P < 0.05$, $n = 20$, 有显著性差异

老化小鼠各脏器中 MDA 含量较年轻小鼠均有所上升 ($P < 0.05$), 说明随着小鼠体内清除氧化自由基能力的下降, 其氧化压力水平随之上升, 这是引起细胞组织老化的因素之一, 因为细胞内的过氧化物会破坏细胞正常的结构, 使其丧失正常的功能, 直到死亡。

2.2 NF- κ B 的免疫组化分析结果 细胞内的氧化压力会激活以 NF- κ B 为核心的信号转导通路, 引起一系列与细胞氧化还原状态相关基因的表达, 这些基因的产物或是使细胞回复到正常的状态, 或是引起细胞的凋亡。NF- κ B 在细胞中的含量是否与细胞的氧化水平相关, 作者用免疫组化分析方法来检测 NF- κ B 在细胞内的含量。结果如图 1 所示。在老化小鼠心脏、肝脏和肺脏中, NF- κ B 的表达量有显著性增加 ($P < 0.01$), 分别上升了 17.9%, 11.9%, 59.4%, 这与细胞清除自由基能力的变化幅度是呈正相关的, 提示在氧化压力下, NF- κ B 转录因子表达水平的上升可能会为后续的老化进程起调节作用。

2.3 EMSA 结果 为了明确 NF- κ B 在老化过程中是否具有调节基因表达的能力, 我们用 EMSA 方法检测了各器官细胞核蛋白是否存在具有 DNA 结合活性的 NF- κ B。放射自显影结果显示, 在老化小鼠各脏器中(图 2 之 2、4、6)确有 NF- κ B 转录因子与特异的寡核苷酸相结合, 在肺脏中的结合活性最高; 而在

年轻小鼠的脏器中则没有激活的 NF- κ B 存在(图 2 之 1、3、5)。提示在老化过程中, NF- κ B 可能会启动一些与老化有关的基因, 其中所涉及到的基因目前还不清楚, 有待于进一步研究。

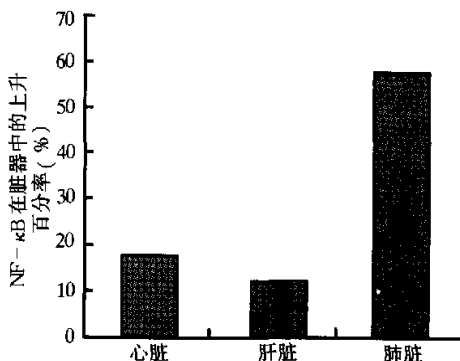


图 1 NF- κ B 在老化小鼠脏器中较年轻小鼠上增加示意图

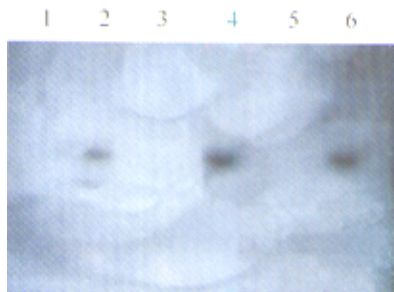


图 2 年轻小鼠与老化小鼠脏器核蛋白的 EMSA 结果
注: 1、3、5 显示, 年轻小鼠心脏、肝脏和肺脏; 2、4、6 显示, 老化小鼠心脏、肝脏和肺脏

3 讨论

由表 1、2 可知老化小鼠的体内氧化水平较年轻小鼠要高, 同时清除自由基水平下降。在机体衰老的几大理论中, 其中之一就是自由基学说。这一理论认为随着年龄的增长, 机体内有害的自由基及其脂质过氧化产物日益增多, 同时抗氧化酶和抗氧化剂则日趋下降, 结果导致细胞膜结构的破坏、DNA 突变、蛋白质变性而最终使细胞溃破。近年来的研究表明, 由自由基而引起的老化机制可能并不是原来所提出的那样简单。在机体的老化过程中, 存在着细胞的凋亡过程。在这一过程中有与老化相关基因的表达。NF- κ B 可能在自由基与老化之间起信号转导的作用。它将细胞内的氧化压力传递到细胞内并调节基因的表达。最终的结果有两种: 一种是抗氧化压力基因的表达, 抑制凋亡; 一种是启动凋亡相关基因的表达^[7]。本工作在老化小鼠中的心脏、肝

脏和肺脏中均检测到了激活的 NF- κ B,提示NF- κ B在动物老化过程中可能起重要作用。NF- κ B也可能成为治疗老化相关疾病的靶点。

王士雯等^[8]在临床中观察到在衰老过程中老年多器官衰竭(multiple organ failure, MOFE)发生时, 73.1%是先发生肺衰竭,而后引起其他器官衰竭。值得注意的是,本实验结果表明,老化小鼠肺部细胞的氧化压力较之其他器官要大, NF- κ B 含量在老化小鼠的肺脏上升幅度最高,达到了 59.4%,这可能是 MODSE 肺启动的分子基础。作者推测这可能是引起 MODSE 及 MOFE 的病因之一,即随着机体衰老的进程,肺部细胞氧化压力增加,激活了这一核转录因子,启动一系列基因的表达。这些基因产物可能会导致肺部细胞的凋亡或肺脏的炎症反应,肺脏功能的降低进而引起其他脏器的衰竭。这一过程所涉及的基因及其产物的分离与鉴定可能是解释衰老过程中出现的 MODSE 的关键所在。虽然目前人们还不太清楚多器官衰竭的发生机制,但以 NF- κ B 为核心的信号通路是值得人们关注的。

参考文献

- 1 Helenius M, Hanninen M, Lehtinen SK, et al. Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative

stress responsive NF- κ B transcription factor in mouse cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, 28:487-498.

- 2 Merja H, Sergiy K, Piia V, et al. Characterization of aging-associated up-regulation of constitutive nuclear factor- κ B binding activity. *Antioxide Redox Signal*, 2001, 3: 147-156.
- 3 Korhonen P, Helenius M, Salminen A. Age-related changes in the regulation of transcription factor NF- κ B in rat brain. *Neurosci Lett*, 1997, 225:61-64.
- 4 王士雯. 老年多器官功能不全综合征的肺启动机制. 中华老年多器官疾病杂志, 2002, 1:4-6.
- 5 朱立平, 陈学清, 主编. 免疫学常用实验方法. 北京:人民军医出版社, 2000. 382-398.
- 6 Rajeshwari M, Susan LS, Luo Y, et al. Age-dependent modulation of NF- κ B expression in rat adrenal gland. *Mechanisms of Aging and Development*. 2001, 123: 1211-1227.
- 7 Jennifer L, Nikki J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*, 2002, 192:1-15.
- 8 王士雯, 韩亚玲, 钱小顺, 等. 1605 例老年多器官功能衰竭的临床分析. 中华老年多器官疾病杂志, 2002, 1: 7-10.

(收稿日期:2002-10-18)

(本文编辑 李棉生)

• 消 息 •

第七届全国心力衰竭学术交流会征文通知

由中国心力衰竭学会、《中国心脏病学杂志》编委会、中国心电信息学分会共同主办的第七届全国心力衰竭学术交流会,拟定于 2003 年 4 月下旬在山东省泰安市召开。会间邀请著名专家讲学。

征文内容:(1)心力衰竭的基础研究、诊断技术、各种治疗的新进展、预防措施研究等;(2)心电信息学研究新进展;(3)征文形式:论著、综述、讲座、经验交流、病例报告、译文等。

征文要求:未发表的论文全文和 800 字以内摘要各 1 份,寄至山东省泰安市泰山医学院附属医院内心力衰竭学会秘书处,邮编 271000。请在信封上注明“会议征文”字样,截止日期:2003 年 4 月 10 日。联系电话:0538-8428157。符合要求的论文可在我会主办及协办的杂志上正式发表,酌收版面费。