

模拟失重大鼠肝组织中NF- κ B的表达及意义

崔彦, 董家鸿, 张铭, 周金莲, 刘子沛, 王平, 李成林, 张建中

■背景资料

机体在失重环境中受到瀑布式的直接和间接的失重应激作用, 正常生理机能受到影响。近年来, 我国航天事业迅猛发展, 航天员特殊训练和载人航天飞行的成功及后续重大任务对航天医学提出了新的要求, 但迄今国内尚未见有关失重和模拟失重应激环境下肝脏生理和病理研究的报道。

崔彦, 董家鸿, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所 重庆市 400038
崔彦, 刘子沛, 王平, 李成林, 中国人民解放军第306医院普通外科 北京市 100101
张铭, 周金莲, 张建中, 中国人民解放军第306医院病理科 北京市 100101
崔彦, 1987年湖南医科大学硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事消化系统疾病的临床与基础研究。
全军“11.5”计划面上基金资助项目, No. 06MA005
作者贡献分布: 此课题由崔彦, 董家鸿及李成林设计; 研究过程主要由崔彦, 张铭及周金莲完成, 刘子沛, 王平及李成林协助; 论文写作由崔彦完成; 实验及论文修改中董家鸿与张建中提供技术指导。
通讯作者: 崔彦, 100101, 北京市朝阳区安翔里9号, 中国人民解放军第306医院普通外科. dryancui@yahoo.com.cn
电话: 010-66356138
收稿日期: 2008-09-25 修回日期: 2008-10-16
接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-08

Expression of nuclear factor-kappa B and its significance in liver tissues of rats during simulated weightlessness

Yan Cui, Jia-Hong Dong, Ming Zhang, Jin-Lian Zhou, Zi-Pei Liu, Ping Wang, Cheng-Lin Li, Jian-Zhong Zhang

Yan Cui, Jia-Hong Dong, Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China
Yan Cui, Zi-Pei Liu, Ping Wang, Cheng-Lin Li, Department of General Surgery, the 306th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China
Ming Zhang, Jin-Lian Zhou, Jian-Zhong Zhang, Department of Pathology, the 306th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China
Supported by: the Grant from the Chinese PLA General Project during the 11th Five-Year Plan Period, No. 06MA005
Correspondence to: Professor Yan Cui, Department of General Surgery, the 306th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China. dryancui@yahoo.com.cn
Received: 2008-09-25 Revised: 2008-10-16
Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in liver tissues of rats under the condition of simulated weightlessness.

METHODS: Eighty-four male adult Wistar rats weighing 280-310 g were randomly assigned to simulated weightlessness group and control group, each with 7 subgroups from 1 to 7 ac-

ording time sequence in day unit. Tail-suspension was used to simulate the weightlessness condition. The expression of NF- κ B p65 was detected by Western blotting analysis and PV-6001 immunohistochemistry respectively.

RESULTS: The tail-suspended rats were upset at the beginning, and seemed adapted to the microgravity condition after 2 to 3 days. Tail-suspension significantly increased liver NF- κ B expression in rats, as compared with the controls ($F = 271.36, P < 0.01$), with peak expression on day 1 and 2, followed by a gradual decline to the normal level on day 5, 6 and 7 ($F = 60.68, P < 0.05$). NF- κ B expression stained as brown particles was mainly detected in rat hepatocytes, also in the infiltrated cells and Kupffer cells. There were three types of intracellular expression according to the location of positive NF- κ B particles, i.e. cytoplasm, nucleus, and cytoplasm plus nucleus, existing alone or co-existing in rat liver.

CONCLUSION: Simulated weightlessness, especially in the early stage, acts as a kind of stress to induce the activation of NF- κ B in liver tissues of rats, suggesting that NF- κ B plays an important role in the cascade reactions and adaptation to the weightlessness stress.

Key Words: Simulated weightlessness; Wistar rat; Liver; Nuclear factor-kappa B; Western blotting; Immunohistochemistry

Cui Y, Dong JH, Zhang M, Zhou JL, Liu ZP, Wang P, Li CL, Zhang JZ. Expression of nuclear factor-kappa B and its significance in liver tissues of rats during simulated weightlessness. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3480-3484

摘要

目的: 研究模拟失重环境下大鼠肝脏组织中NF- κ B的表达及意义。

方法: 成年♂Wistar大鼠84只, 随机分为模拟失重组和对照组, 每组又分别设1、2、3、4、5、6和7 d共7个时相点, 每时相点模拟失重和同步对照各6只大鼠。采用尾悬吊法建立模拟

■同行评议者

丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

失重动物模型. 各组大鼠肝组织中NF- κ B表达分别应用Western blot和免疫组化PV-6001法进行检测.

结果: 在尾悬吊1-2 d期间, 大鼠焦躁不安, 饮水量减少, 精神较差, 活动减弱, 2-3 d后有所适应, 逐渐恢复稳定状态. 模拟失重环境下大鼠肝脏NF- κ B表达水平明显升高, 1、2 d悬尾组大鼠肝组织中NF- κ B表达率明显高于对照组($F = 271.36, P < 0.01$), 其后, NF- κ B表达水平呈明显下降趋势($F = 60.68, P < 0.05$), 5-7 d悬尾组NF- κ B表达水平接近对照组, 差异无统计学意义. NF- κ B阳性产物主要见于实验大鼠肝细胞内, 亦见于炎细胞及Kupffer细胞内, 可分为胞质型、核型、核浆型等三个类型, 单独或混合存在.

结论: 模拟失重使大鼠肝脏组织中NF- κ B表达发生明显变化, 提示在失重环境中肝脏NF- κ B的早期高表达和逐渐恢复过程与失重应激反应及失重耐受有密切关系.

关键词: 模拟失重; 大鼠; 肝脏; 核因子 κ B; 蛋白免疫印迹法; 免疫组化

崔彦, 董家鸿, 张铭, 周金莲, 刘子沛, 王平, 李成林, 张建中. 模拟失重大鼠肝组织中NF- κ B的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3480-3484

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3480.asp>

0 引言

微重力环境对于机体来说, 是一种特殊类型的不良刺激. 机体在失重环境中发生诸多变化, 导致一系列病理生理改变^[1]. 肝脏受到瀑布式的直接和间接的失重应激作用, 正常生理机能受到影响. Merrill *et al*^[2]研究搭乘Cosmos 2044生物卫星大鼠的肝脏, 发现失重可对肝脏的蛋白质、糖原及多种酶的代谢产生重要影响. Abraham *et al*^[3]研究搭乘苏联Cosmos 936生物卫星的大鼠, 发现肝脏的部分代谢酶水平发生变化, 但短期后即能恢复. Rivera *et al*^[4]进行地面模拟失重动物实验, 发现微重力环境下胃肠道蠕动缓慢, 菌群移位, 黏膜屏障发生障碍, 导致内毒素成分进入门静脉而对肝脏造成损伤. 近年来, 我国航天事业迅猛发展, 航天员特殊训练和载人航天飞行的成功及后续重大任务对航天医学提出了新的要求, 但迄今国内尚未见有关失重和模拟失重应激环境下肝脏生理和病理研究的报道^[5]. 本研究通过尾悬吊法模拟失重动物实验, 观察实验大鼠肝脏组织中NF- κ B表达特性, 探讨失重

环境对肝脏造成的影响及其机制.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级成年健康♂Wistar大鼠84只, 体重280-310 g, 由中国农业大学实验动物研究所提供. NF- κ B mAb(Sigma, USA), GAPDH(Ambion, USA), 碱性磷酸酶标记山羊抗小鼠IgG(GAR-AP, Zymed, USA). NF- κ B p65 mAb(Santa Cruz, USA), PV-9000即用型二步法检测盒(北京中山生物技术有限公司). NBT(Sigma, USA), BCIP(Sigma, USA), DTT(Sigma, USA), PVDF膜(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), TEMED(Sigma, USA). 转膜仪(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), 低温离心机5810R(Eppendorf, Hamburg, Germany), 微型高速离心机(Eppendorf, Hamburg, Germany), 垂直电泳槽(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), 琼脂糖水平电泳槽(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), 凝胶成像系统(AlphaImager™ 2200, USA).

1.2 方法

1.2.1 分组: 大鼠适应饲养1 wk后进行实验. 随机分为模拟失重组和对照组, 每组又分别设1、2、3、4、5、6及7 d共7个时相点, 每时相点模拟失重和同步对照各6只大鼠.

1.2.2 造模与取材: 参照陈杰 *et al*的方法采用尾悬吊法建立模拟失重大鼠模型^[6]. 大鼠单笼饲养, 实验组大鼠尾部悬于笼顶, 前肢踏于笼底. 对照组大鼠置于相同鼠笼中, 自由活动. 所有大鼠可自由进食、饮水. 动物室温度保持在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 每天灯光照明12 h与黑暗交替循环, 保持适当湿度及通风条件. 各时相点实验结束时, ip戊巴比妥钠(45 mg/kg)将实验及对照动物麻醉, 无菌操作, 经腹正中中线剖腹, 取肝右叶组织保存于液氮中, 左叶肝组织浸入40 g/L中性甲醛中固定.

1.2.3 Western blot检测大鼠肝组织NF- κ B蛋白表达: (1)蛋白质提取: 从液氮中取出肝组织, 放入玻璃匀浆器中, 加入200 μL 细胞裂解液, 在冰上将组织制成匀浆并在液氮中反复冻溶裂解细胞3-5次, 然后转移至离心管中, 4°C 高速离心(12 000 r/min)80 min. 吸出上清液, 分装, -80°C 保存备用; (2)加样, 电泳, 160 V, 1 h; (3)转膜: 电泳完毕后切取60-94 kDa和27-45 kDa区, 转膜液浸泡20 min, 转膜100 V, 100 min; (4)免疫反应: 水平摇床上用TBST浸泡PVDF膜10 min, 室温下脱色摇床上摇动封闭1-3 h, 用TBS稀释一抗NF- κ B 1 : 200, GAPDH 1 : 10000, 与PVDF膜一起

■ 研发前沿

NF- κ B控制着大量基因的激活, 介导多种炎性介质和急性期反应蛋白等的转录表达, 参与细胞凋亡的调控. NF- κ B在机体应激反应过程中的重要作用及机制是目前研究的热点问题.

■ 相关报道

研究尾悬吊模拟失重大鼠肝脏组织中NF- κ B的表达特点并探讨其作用机制, 国内外尚未见类似研究报道.

■ 创新盘点

本研究应用Western blot和免疫组化PV-6001法研究模拟失重大鼠肝脏组织中NF- κ B表达特性,发现在模拟失重环境中实验大鼠肝脏NF- κ B表达发生明显变化,其早期高表达及渐降过程与失重应激反应和失重耐受有一定关系。

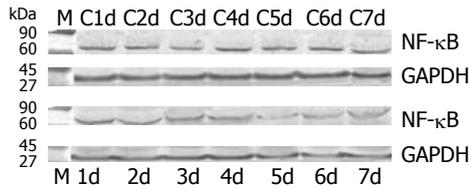


图1 Western blot半定量检测悬吊大鼠肝脏NF- κ B p65蛋白水平的变化。M: Marker。

4℃条件下摇动孵化过夜。然后用TBST在脱色摇床上洗10 min×3次。加TBS稀释碱性磷酸酶标记的二抗与PVDF膜在常温下育孵2-3 h,继用TBST在脱色摇床上洗10 min×3次;(5)显色:用碱性磷酸酶底物BCIP/NBT显色10 min。

1.2.4 免疫组化检测大鼠肝组织NF- κ B表达:(1)免疫组化PV-6001法:常规切片,脱蜡至水;3%过氧化氢室温10 min以阻断内源性过氧化物酶;PBS冲洗3 min×3次,枸橼酸钠高压锅热修复2 min后自然冷却,PBS洗3 min×3次;加入一抗NF- κ B(1:100)于湿盒中4℃过夜;PBS洗3 min×3次,加入辣根酶羊抗兔多聚体,室温30 min;PBS洗3 min×3次;染色按照PV-9000即用型二步法检测盒说明进行操作。用PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照;(2)NF- κ B阳性表达判定:以细胞核和(或)胞质中有明显的棕黄色颗粒为阳性。每张切片随机计数5个高倍视野(×400)下的阳性细胞数,切片边缘视野不计,以排除“边缘效应”的干扰。阳性指数以NF- κ B阳性细胞占所有细胞的百分率(%)表示。

统计学处理 数据以mean±SD表示,结果用SPSS11.0统计软件进行t检验和方差分析。 $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物情况 本研究各组动物在实验期间无死亡。在尾悬吊1-2 d,大鼠焦躁不安,饮水量减少,精神较差,活动减弱,2-3 d后有所适应,逐渐恢复稳定状态。

2.2 Western blot检测结果 肝组织中NF- κ B的Western blot分析结果表明,各实验组及对照组大鼠肝脏组织中均可检测到70 kDa的NF- κ B表达(图1)。与对照组比较,模拟失重1 d组大鼠肝脏组织中NF- κ B蛋白水平显著升高,并形成高峰,差异有统计学意义($F_{\text{方差值}} = 13.27, P<0.05$)。随着模拟失重时间的延长,NF- κ B蛋白表达水平呈下降趋势,其中3-5 d组NF- κ B仍在较高水平表达,与对照组相比差异不显著。而6-7 d组NF- κ B表达

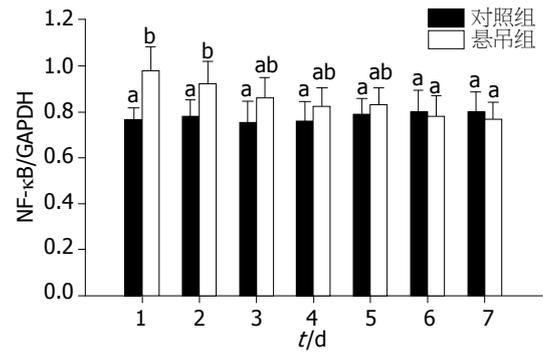


图2 各组大鼠肝脏NF- κ B/GAPDH的灰度比值,字母不同代表差异显著($P<0.05$)。

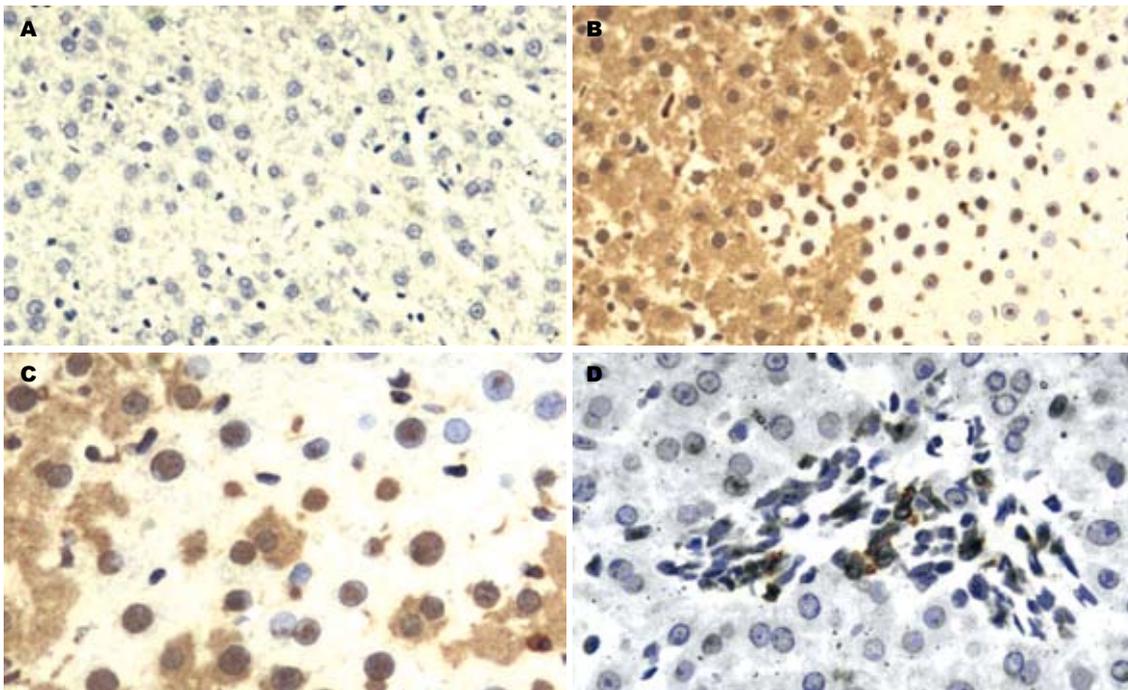
则低于正常对照,差异无统计学意义(图2)。

2.3 NF- κ B免疫组化结果 NF- κ B阳性产物主要见于实验大鼠的肝细胞内,亦可见于炎细胞及Kupffer细胞内。棕黄色颗粒状的NF- κ B表达位于细胞质及细胞核中,分布不均,呈单个散在或小片状分布,可分为胞质型、核型、核浆型等三个类型,单独或混合存在。在肝细胞核型表达阳性中,可见全核阳性者,也可见局部碎片状阳性者,且主要位于核仁区(图3)。结果显示,1、2 d悬尾组大鼠肝组织中NF- κ B表达率明显高于对照组($F_{\text{方差值}} = 271.36, P<0.01$),随着模拟失重时间的延长,NF- κ B表达水平呈明显下降趋势($F_{\text{方差值}} = 60.68, P<0.05$),5-7 d悬尾组NF- κ B表达水平接近对照组,差异无统计学意义(图4)。

3 讨论

NF- κ B是Sen和Baltimore于1986年首先报道从B淋巴细胞核抽提物中检出的可与免疫球蛋白轻链基因增强子 κ B序列特异结合的核蛋白因子^[7]。NF- κ B广泛存在于真核细胞内,属于Rel蛋白家族,为二聚体蛋白分子,包含多种亚单位结构,NF- κ B p65是其主要成员之一,表达最广泛,相对稳定,生物活性最强。NF- κ B调控大量基因的表达与活性,介导多种炎性介质和急性期反应蛋白等的转录表达,参与细胞凋亡的调节,具有多向性特征。通常情况下,细胞内NF- κ B与I κ B抑制蛋白结合在一起,处于失活状态。多种因素可激活NF- κ B,活化后的NF- κ B从细胞质转移到细胞核内的DNA特定黏附部位,进而启动和调控转录程序,发挥生物学效应^[7-9]。

研究发现,NF- κ B与肝脏的多种病变相关,在肝脏的急性损伤过程中发挥重要作用^[10]。杨文军 *et al*^[11]报道大鼠创伤性炎症肝脏损伤后NF- κ B活性明显升高,与肝脏结构和功能改变基本



应用要点
 本研究为进一步探讨失重和模拟失重环境对肝脏的影响奠定基础, 为航天员特殊强化训练及航天飞行过程中的有害因素防护及保健提供理论基础。

图 3 模拟失重大鼠肝脏NF-κB表达的影响(PV-6001). A: 对照组(×100); B: NF-κB高表达, 核浆型, 悬吊1 d组所见(×100); C: 肝细胞中NF-κB核型表达, 可见全核阳性及局部碎点状阳性者, 主要位于核仁区(×200); D: NF-κB阳性产物亦可见于炎细胞和Kupffer细胞内(×200).

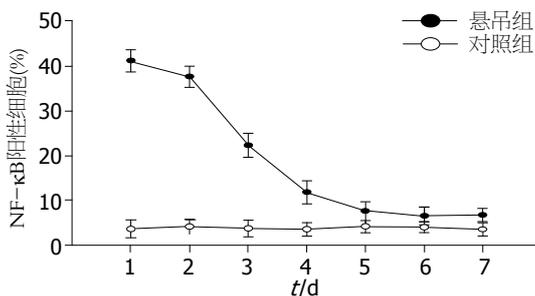


图 4 各组NF-κB免疫组化结果比较(mean ± SD).

一致. Salazar-Montes *et al*^[12]研究发现肝脏急性损伤30 min后NF-κB即被激活. 王春妍 *et al*^[13]研究认为, NF-κB通过调控其下游基因加重肝脏损伤.

失重和模拟失重环境下肝脏NF-κB的表达特征如何? 国内外尚未见研究报道. 本实验结果发现, 在模拟失重早期(48 h内), 大鼠肝脏组织中NF-κB表达水平明显升高, 应用Western blot半定量检测和免疫组化PV6001组织染色的结果一致. 分析NF-κB的这种变化, 可能缘自失重环境所造成的肝脏分子水平的应激反应. Wise *et al*^[14]的研究表明, 微重力环境引起脑组织氧化应激(oxidative stress)并活化NF-κB, 引发转录因子高表达. 近期还有学者研究发现, NF-κB在模拟失重小鼠睾丸组织中表达异常, 伴随睾丸重量减轻和睾酮水平下降的同时, NF-κB以及

Caspase-8和Caspase-3的表达水平明显升高, 认为失重环境导致NF-κB及Caspase-8、Caspase-3过度活化进而激活了与细胞凋亡有关的信号通路^[15]. 显然, 模拟失重环境下肝组织NF-κB高表达应是肝脏失重应激反应的一部分, 对NF-κB高表达是否导致肝脏细胞凋亡笔者将做进一步研究. 本实验还发现, 在尾悬吊初期, 大鼠焦躁不安, 饮水量减少, 精神较差, 活动减弱, 而24-48 h后则有所适应, 逐渐恢复稳定状态, 这一现象与肝组织中NF-κB表达先升后降的结果似乎同步, 提示肝脏NF-κB表达在失重耐受(microgravity tolerance)过程中亦可能发挥一定作用. 理论上推测, NF-κB表达及基因调控对失重应激环境可形成一种应激耐力, 此机制是否成立及其在航天员强化训练中的意义则有待深入研究.

本研究结果显示, 实验大鼠肝组织中NF-κB阳性产物主要见于肝细胞, 亦见于炎细胞及Kupffer细胞. 笔者依据NF-κB在细胞内表达部位的不同而将其分为胞质型、核型、核浆型等三种类型, 各种类型可单独或混合存在. 在核型NF-κB阳性表达类型中, 可见全核阳性者, 也可见局部碎点状阳性者, 且主要位于核仁区. 分析认为, NF-κB在肝脏细胞内的分布及其表达特征说明了NF-κB的应激活化和发挥生物学效应的程序、部位、强度及消长过程; 核仁是rRNA基

■同行评价

本文立意新颖,设计合理,结果可信,对我国航空航天员的合理训练可能有一定的指导作用。

因存储、rRNA合成加工以及核糖体亚单位的装配场所, NF- κ B在核仁功能区染色形态的不同,可能涉及失重应激反应的程度及时相效应,与NF- κ B功能演变和对靶基因信息转录的调控力度有关。

总之,在失重应激环境中,肝脏乃至机体全身的应激损伤、保护与适应,基因调控过程的启动、瀑布效应与反馈等机制,显然是一个十分复杂的系统, NF- κ B在其中发挥的具体作用以及所涉及的其他介导因素,尚需要进一步探讨。

4 参考文献

- Graebe A, Schuck EL, Lensing P, Putcha L, Derendorf H. Physiological, pharmacokinetic, and pharmacodynamic changes in space. *J Clin Pharmacol* 2004; 44: 837-853
- Merrill AH Jr, Wang E, LaRocque R, Mullins RE, Morgan ET, Hargrove JL, Bonkovsky HL, Popova IA. Differences in glycogen, lipids, and enzymes in livers from rats flown on COSMOS 2044. *J Appl Physiol* 1992; 73: 142S-147S
- Abraham S, Lin CY, Volkmann CM, Klein HP. Biochemical changes in rat liver after 18.5 days of spaceflight. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983; 172: 334-339
- Rivera CA, Tcharmtchi MH, Mendoza L, Smith CW. Endotoxemia and hepatic injury in a rodent model of hindlimb unloading. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1656-1663
- 沈羨云, 王林杰. 我国失重生理学研究进展. *航天医学与医学工程* 2008; 21: 182-187
- 陈杰, 马进, 丁兆平, 张立藩. 一种模拟长期失重影响的大鼠尾部悬吊模型. *空间科学学报* 1993; 2: 159-162
- Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47: 921-928
- Leeman JR, Gilmore TD. Alternative splicing in the NF-kappaB signaling pathway. *Gene* 2008; 423: 97-107
- 苏剑东, 吴灵飞. NF-kappaB与细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1411-1416
- Czaja MJ. Cell signaling in oxidative stress-induced liver injury. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 378-389
- 杨文军, 余正平, 张启瑜, 宋其同, 梁华平, 徐祥, 朱冠保, 施红旗, 蒋飞照. 核因子- κ B活性在创伤性炎症大鼠肝脏损伤中的变化及其意义. *肝胆胰外科杂志* 2006; 18: 13-15
- Salazar-Montes A, Ruiz-Corro L, Sandoval-Rodriguez A, Lopez-Reyes A, Armendariz-Borunda J. Increased DNA binding activity of NF-kappaB, STAT-3, SMAD3 and AP-1 in acutely damaged liver. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5995-6001
- 王春妍, 范玉强, 迟宝荣, 曹武奎, 李海. 核因子-kappa B及其下游因子TNF-alpha、Bcl-2在急性肝损伤中的作用及机制. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2804-2808
- Wise KC, Manna SK, Yamauchi K, Ramesh V, Wilson BL, Thomas RL, Sarkar S, Kulkarni AD, Pellis NR, Ramesh GT. Activation of nuclear transcription factor-kappaB in mouse brain induced by a simulated microgravity environment. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2005; 41: 118-123
- Sharma CS, Sarkar S, Periyakaruppan A, Ravichandran P, Sadanandan B, Ramesh V, Thomas R, Hall JC, Wilson BL, Ramesh GT. Simulated microgravity activates apoptosis and NF-kappaB in mice testis. *Mol Cell Biochem* 2008; 313: 71-78

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策

本刊讯 本刊实行作者贡献及同行评议公开政策,具体格式如:(1)作者贡献分布:陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等;此课题由陈湘川,庞丽娟,陈玲,杨兰,张金芳,齐妍及李洪安设计;研究过程由陈玲,杨兰,张金芳,蒋金芳,杨磊,李锋及曹秀峰操作完成;研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供;数据分析由陈湘川,杨兰及庞丽娟完成;本论文写作由陈湘川,庞丽娟及李洪安完成。(2)同行评议者:房静远教授,上海交通大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所;韩新巍教授,郑州大学第一附属医院放射科;匡安仁教授,四川大学华西医院核医学科。(常务副总编辑:张海宁 2008-11-08)