

核结合因子 κ B 及 bcl-2/bax 在 PQ 中毒鼠肺组织中的表达

王 晔, 曲 艳, 龙 波
(昆明市延安医院, 云南昆明 650101)

[摘要] 目的 探讨 NF- κ B、bcl-2/bax 基因在百草枯中毒鼠所致急性肺损伤中的表达. 方法 80 只 SD 雄性大鼠分为对照组 (C 组 30 只)、百草枯中毒组 (PQ 组 50 只). PQ 组一次性灌胃 PQ 25 mg/kg 染毒, C 组予等体积生理盐水灌胃. 观察各组大鼠在中毒后 6 h、12 h、1 d、3 d、5 d 肺组织病理改变, 采用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测肺组织 bcl-2 和 bax mRNA 的表达. 采用 ELISA 方法检测肺泡灌洗液中 PMN 的 NF- κ B p65 表达. 结果 C 组肺组织结构完整, 无炎症细胞渗出. PQ 组肺组织炎性细胞浸润明显增多, 且随时间推移肺损伤加重. PQ 组 bcl-2 mRNA 的表达于 6 h 后最强, 至 3 d 仅有少量表达; bax mRNA 的表达于 1 d 达高峰, 第 5 天仍有少量表达; bcl-2/bax 比例为促凋亡的 bax 基因占优势, 且随着时间的推移这种优势越来越明显; 与相应点 C 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); PQ 组染毒 1 d 时 NF- κ B p65 即有明显表达, 3 d 时表达最强, 5 d 后明显减弱, 与 C 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$). PQ 组 NF- κ B p65 与 bcl-2 表达呈正相关 ($r = 0.71, P < 0.01$); NF- κ B p65 与 bax 表达呈负相关 ($r = -0.77, P < 0.01$). 结论 NF- κ B、bcl-2/bax 介导的肺细胞炎症反应可能是 PQ 中毒所致急性肺损伤的机制之一.

[关键词] 百草枯; 急性肺损伤; 核结合因子 κ B; b 细胞淋巴瘤/白血病-2; 促凋亡基因 bax
[中图分类号] R595.4 [文献标识码] A [文章编号] 2095-610X (2015) 03-0030-04

Expressions of Nuclear Factor Kappa B and Apoptosis Gene bcl-2/ bax in the Lung of Paraquat Poisoning Rats

WANG Ye, Qu Yan, LONG Bo
(Yan'an Hospital of Kunming City, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] Objective To explore the expressions of nuclear factor kappa B (NF- κ B), apoptosis gene bcl-2 (b-cell leukemia-2) and bax (bcl-2-associated death promoter) in lung of paraquat poisoning rats. Methods Ninety SD male rats were randomly divided into 2 groups: normal control group (C30 rats), paraquat poisoning group (PQ60 rats). The PQ group rats were given paraquat by gastric perfusion (25 mg/kg). The C group rats were given saline by gastric perfusion. Histological changes of lung tissues under light microscope were observed. And the expression of bcl-2 and bax mRNA in lung tissues of rats were measured by RT-PCR at different time of 6 h, 12 h, 1 d, 3 d, 5 d and 7 d after poisoning. The expression of NF- κ B p65 in PMN of BALF was determined by ELISA. Results The degree of lung injury in PQ group was higher than that in C group. The relative expression levels of bcl-2 in PQ (6 h and 3 d) subgroups were significantly higher than the control group ($P < 0.05$). The relative expression levels of bax in PQ (6 h, 12 h, 1 d, 3 d) subgroups were significantly higher. The content of NF- κ B p65 in PQ group was higher than that in C group. The expression of NF- κ B was positively correlated with that of bcl-2 ($r = 0.71, P < 0.01$), and negatively correlated with that of bax ($r = -0.71, P < 0.01$). Conclusion NF- κ B and bcl-2/bax-mediated lung tissue cell apoptosis may be one of the major causes which leading to the lung injury in acute paraquat poisoned rats.

[Key words] Paraquat; NF-kappaB; Acute lung injury; bcl-2; bax

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2009ZC159M)

[作者简介] 王晔 (1982~), 女, 河南周口市人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事急诊医学临床工作.

[通讯作者] 曲艳. E-mail:quyan1964@163.com

百草枯 (paraquat, PQ) 是目前广泛使用的除草剂, 肺是 PQ 中毒的主要靶器官, 早期的特征表现主要是急性肺损伤 (acute lung injury, ALI)^[1], 晚期为肺纤维化. 炎症反应、基因异常表达在百草枯所致急性肺损伤中起到一定作用. 核结合因子- $\kappa\beta$ (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa\beta$)^[2] 是一种转录因子, 调控多种细胞因子、基因的转录, 在炎症反应和细胞凋亡等方面起重要作用. bcl-2 (b cell leukemia/lymphoma-2) 和 bax (bcl-2 associated X protein gene) 为凋亡相关基因, 二者基因启动子或增强子上有 $\kappa\beta$ 位点, NF- $\kappa\beta$ 在核内与 $\kappa\beta$ 序列特异结合, 可调控其基因转录^[3]. 本实验观察 PQ 中毒鼠肺组织中 NF- $\kappa\beta$ 蛋白与 bcl-2/bax mRNA 的表达情况, 以了解百草枯所致 ALI 发病的可能机制, 期待为靶向治疗提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

清洁级SD雄性大鼠80只, 体重200~250 g, 昆明医学院实验动物中心提供. 1%的百草枯溶液(山东三元工贸有限公司). NF- $\kappa\beta$ 试剂盒(大连宝生物); RNA提取试剂Trizol Reagent(美国Invitrogen公司), RT-PCR试剂盒(美国Promega公司), bcl-2、bax及 β -actin引物合成(美国Promega公司).

1.2 实验动物分组及标本采集

80只SD雄性鼠随机分成2组: PQ组50只给予1%的PQ(25 mg/kg)一次性灌胃染毒造模; C组30只给予相应体积的生理盐水灌胃造模. 于染毒后6、12 h、1 d、3 d及5 d时PQ组各处死10只. 于相同时间点C组处死5只. 取鼠右肺相同部位HE染色病理观察, 余肺组织冷生理盐水冲洗后-70℃冻存.

1.3 检测方法

采用ELISA方法检测肺泡灌洗液中PMN (polymorphonuclear neutrophil, PMN) 的NF- $\kappa\beta$ p65表达. 按NF- $\kappa\beta$ 试剂盒操作说明进行, 一抗为兔抗NF- $\kappa\beta$ P65多抗, 二抗为相应生物素标及辣根过氧化物酶标记. 阴性对照用PBS代替一抗. 体积较小且核分叶的细胞为PMN. 操作过程. 镜下随机选取5个高倍视野, 计算阳性细胞(以胞膜、胞质或胞核出现棕黄色着色颗粒为阳性标记)占细胞总数的百分比.

1.4 bcl-2 和 bax mRNA 的表达

首先提取肺组织总RNA, 进行RT-PCR. β -actin上游引物5'-CACTGCCGCATCCTCTTCCT-C-3', 下游引物5'-CTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3'

; bax上游引物5'-TGCAGAGGATGATTGCTGAC-3', 下游引物5'-GAT-CAGCTCGGGCACTTTAG-3'; bcl-2上游引物5'-CGACTTTGCAGAGATGTC-CA-3', 下游引物5'-ATGCCCGGTTTCAGGTACTC-AG-3'. 扩增条件: 94℃预变性3 min, 1个循环; 94℃变性30 s, 退火(bcl-2 51℃, bax 53℃, β -actin 54℃) 30 s, 72℃延伸30 s, 共35个循环; 最后72℃延伸10 min, 1个循环. 取PCR产物在质量分数为1.5%的琼脂糖凝胶上电泳, 用凝胶图像分析系统(美国Media Cybernetics公司Image Pro Plus)分析结果. 以目的因子/ β -actin的比值表示目的因子的相对表达水平.

1.5 统计学处理

采用SPSS统计软件, 计量资料以表示, 方差齐时采用方差分析及LSD-*t*检验, 方差不齐时采用秩和检验, 相关性分析采用Pearson法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 肺组织病理学观察

C组几乎无炎症细胞渗出, 结构基本完整. PQ组可见大量PMN等炎症细胞浸润, 炎症细胞数量随着时间的延长增多, 肺泡壁断裂, 肺损伤程度逐渐加重.

2.2 肺泡灌洗液中 PMN 的 NF- $\kappa\beta$ p65 表达

C组NF- $\kappa\beta$ p65不表达或有很弱的表达; PQ组染毒1 d时NF- $\kappa\beta$ p65即有明显表达, 3 d时表达最强, 5 d后明显减弱, 与C组比较差异有统计学意义($P < 0.05$).

2.3 鼠肺组织 bcl-2、bax mRNA 表达

PQ组bcl-2 mRNA的表达6 h后最强, 与C组相比差异有统计学意义($P < 0.05$), 之后下降至第3 d仅有少量表达, 与C组相比差异不再有统计学意义($P > 0.05$). bax mRNA的表达6 h后增强与C组相比差异有统计学意义($P < 0.05$). 染毒后1 d达高峰, 之后下降, 至染毒后5 d仅有少量表达, 与C组相比差异不再有统计学意义($P > 0.05$). PQ组: bcl-2/bax比例一直为促凋亡的bax基因占优势, 且随着时间的推移这种优势越来越明显, 见表1.

2.4 NF- $\kappa\beta$ p65 bcl-2 和 bax 表达的相关性

经Pearson法直线相关分析发现. PQ组NF- $\kappa\beta$ p65阳性表达与bcl-2灰度值间相关($P < 0.01$); NF- $\kappa\beta$ p65阳性表达与bax灰度值间相关($P < 0.01$), 见图1~图3.

表 1 各组鼠 NF- κ β 阳性率 bcl-2/bax mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 The expression of bcl-2/bax mRNA and the positive rate of NF- κ B in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间点	n	bcl-2 mRNA	bax mRNA	NF- κ β 阳性率 (%)
C 组	6 h	5	0.63 \pm 0.04	0.83 \pm 0.03	8.15 \pm 2.45
	1 d	5	0.69 \pm 0.02	0.84 \pm 0.04	7.98 \pm 1.56
	3 d	5	0.70 \pm 0.06	0.83 \pm 0.03	8.50 \pm 2.33
PQ 组	6 h	10	1.38 \pm 0.46 [#]	0.98 \pm 0.15 [#]	16.92 \pm 4.53 [#]
	12 h	10	1.12 \pm 0.28 [#]	1.45 \pm 0.26 [#]	20.72 \pm 5.24 [#]
	1 d	10	0.93 \pm 0.12 [#]	1.54 \pm 0.41 [#]	26.55 \pm 5.78 [#]
	3 d	10	0.81 \pm 0.07 [#]	1.17 \pm 0.35 [#]	30.43 \pm 7.15 [#]
	5 d	10	0.78 \pm 0.10	0.98 \pm 0.03	15.46 \pm 3.67 [#]

与 C 组比较, [#] $P < 0.05$.

3 讨论

凋亡是细胞正常生长的生理调节方式,对维持细胞内外环境的稳定起重要作用.细胞凋亡受多种基因的调控,bcl-2 是公认的细胞凋亡调节基因.于 1985 年发现 bcl-2 基因,是一类新的癌基因家族成员.该家族包括有抑制凋亡的 bcl-2 和诱导凋亡的 bax 基因.研究表明^[4],bcl-2/bax 二者形成一个凋亡调控系统:当 bax/bax 同源二聚体形成,便诱导凋亡;随着 bcl-2 蛋白表达量上升,形成异源二聚体 bcl-2/bax 抗凋亡的作用.Suzuki 等^[5]利用 bcl-2 转基因小鼠促进 bcl-2 蛋白大量表达,抑制切冬酶蛋白激活,凋亡细胞减少.另有文献报道^[6],在注射 LPS 的大鼠模型中,注射后 12h 内随时间延长肺泡上皮细胞 bcl-2 表达减弱,促凋亡基因 bax 则表达增加,bcl-2/bax 减小,凋亡增加.

NF- κ β 作为一类核转录因子家族,精密调节着炎症反应和细胞凋亡.NF- κ β 是静息状态下失活,可被炎症刺激活化的蛋白质因子.当受到一定的刺激后 NF- κ β 发生活化,活化的 NF- κ β 结合在靶基因启动子或增强子上的位点上,从而启动或增强该基因的转录^[7].在百草枯诱导下 NF- κ β 与启动子区域结合增强,启动应激反应蛋白合成,引起细胞凋亡^[8].bcl-2/bax 二者基因启动子或增强子上有 κ β 位点,NF- κ β 在核内与 κ β 序列特异结合,可调控其基因转录.

本结果表明,百草枯中毒所致急性肺损伤模型中 NF- κ β 、bcl-2 及 bax 基因均有表达,这与大多数研究结果一致.bcl-2/bax 比例为促凋亡的 bax 基因占优势,且随着时间的推移这种优势越来越明显;相应时间点的肺组织病理损伤加重.NF- κ β p65 表达与 bcl-2 呈正相关;NF- κ β p65 表达与 bax 呈负相关.

综上所述,过度炎症反应和细胞凋亡的不协调

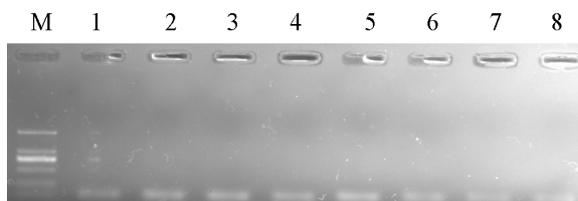
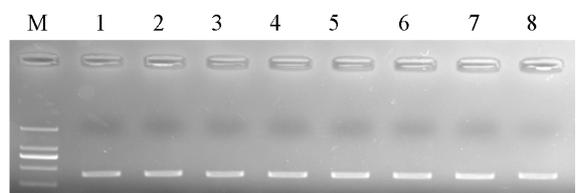


图 1 bcl-2 mRNA 表达水平

Fig. 1 The expression of bcl-2 mRNA

M:marker; 1、2、3、4、5:PQ 组 6、12 h、1 d、3 d、5 d 的表达; 6、7、8:C 组 6、1 d、3 d 的表达.

图 2 β -actin mRNA 表达水平Fig. 2 The expression levels of β -actin mRNA

M:marker; 1、2、3、4、5:PQ 组 6、12 h、1 d、3 d、5 d 的表达; 6、7、8:C 组 6、1 d、3 d 的表达.

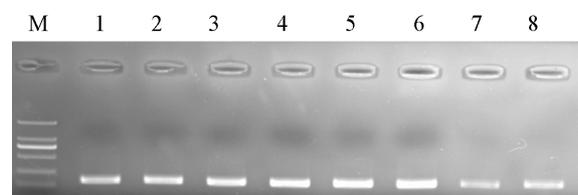


图 3 bax mRNA 表达水平

Fig. 3 The expression levels of bax mRNA

M:marker; 1、2、3、4、5:PQ 组 6、12 h、1 d、3 d、5 d 的表达; 6、7、8:C 组 6、12 h、1 d、3 d、5 d 的表达.

在百草枯所致急性肺损伤的病理形成过程中有着比较重要的作用. bcl-2/bax 的相互作用是诱导细胞凋亡的途径之一, 而此途径在转录水平受 NF- $\kappa\beta$ 的调控. 进一步明确该凋亡途径作用机制并予以干预, 对于治疗百草枯中毒可能是一种新的启发.

[参考文献]

- [1] 李敬, 王岚. 川芎嗪治疗百草枯中毒急性肺损伤的疗效分析[J]. 河北医药, 2011, 33(15): 2 269 - 2 270.
- [2] ATREYA I, ATREYA R, NEURATH M F. NF- κ B in inflammatory Bowel disease [J]. J Intern Med, 2008, 263 (6): 591 - 596.
- [3] YAMAMOTO Y, GAYNOR R B. KappaB kinases: key regulators of the NF- κ B pathway [J]. Trends Biochem Sci, 2004, 29(2): 72 - 79.
- [4] KASTELAN M, MASSARI L P, BRAJAC I. The role of bcl-2 family proteins in psoriasis [J]. Lijec Vjesn, 2010, 132(1/2): 31 - 33.
- [5] SUZUKI C, ISAKA Y, SHIMIZU S. Bcl-2 protects tubular epithelial cells from ischemia reperfusion injury by inhibiting apoptosis [J]. Cell Transplant, 2008, 17(1-2): 223 - 229.
- [6] 李立萍, 张建新, 李兰芳, 等. LPS性肺损伤大鼠一氧化氮合酶表达和肺细胞凋亡变化[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(10): 1 996 - 2 000.
- [7] Wei X, ZHOU D, WANG H, et al. Effects of pyridine analogs of curcumin on growth, apoptosis and NF- $\kappa\beta$ activity in prostate cancer PC-3 cells [J]. Anticancer Res, 2013, 33(4): 1 343 - 1 350.
- [8] ISHIDA Y, TAKAYASU T, KIMURA A, et al. Gene expression of cytokines and growth factors in the lung after paraquat administration in mice [J]. Le Med, 2006, 8(3): 102 - 109.
- (2014 - 12 - 03 收稿)
-
- (上接第 8 页码)
- [6] 黄晓燕, 王丽珍. 5种螺蛳属动物和中国圆田螺COI基因序列分析[J]. 水生态学杂志, 2008, 1(1): 106 - 108.
- [7] SCHWENDINGER P J, GIRIBET G. The systematics of the south-east asian genus fangensis rambla (opiliones: cyphophthalmi: stylocellidae)[J]. Invertebrate Systematics, 2005, 19(4): 297 - 323.
- [8] MITA E S, THOMAS K K, HENRY M, et al. Molecular phylogenetic investigations of the viviparidae (gastropoda: caenogastropoda) in the lakes of the rift valley area of africa [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2009, 52(3): 797 - 805.
- [9] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T G, et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(22): 4 673 - 4 680.
- [10] XIA X, XIE Z, DAMBE. Data analysis in molecular biology and evolution [J]. Journal of Heredity, 2001, 92(4): 371 - 373.
- [11] SWOFFORD D L, PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) Version 4 [M]. Sunderland: Sinauer Associates, 2003: 1 - 134.
- [12] POSADA D, BUCKLEY T R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests [J]. Systematic Biology, 2004, 53(5): 793 - 808.
- [13] NEVILL G. List of the Mollusca brought back by Dr. J. Anderson from yunnan and upper burma, with descriptions of new species [J]. Journal of the Asiatic Society of Bengal, 1877, 46(1): 14 - 41.
- [14] 刘月英, 张文珍, 王跃先, 等. 中国经济动物志: 淡水软体动物[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 9 - 10.
- (2015 - 01 - 16 收稿)