文章编号:1000-5404(2006)08-0743-03

论著

严重烧伤对SRC-3基因敲除小鼠肝脏NF-κB表达及核转位的影响

杜智勇[1],粟永萍[1],徐建明[2],廖 岚[2],冉新泽[1],李 军[1],王峰超[1] ([1]第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[2]Department of Molecular Biology, Baylor College of medicine, Houston, Texas 77030)

提 要:目的 研究烧伤对SRC-3基因敲除小鼠转录因子NF-κB表达及核转位的影响。**方法** 以SRC-3基因敲除小鼠为实验组,以野生型小鼠为对照组,以小鼠15%~20% TBSAⅢ度烧伤为实验模型,观察两组在严重烧伤前、烧伤后1、6、12 h肝脏总蛋白NF-κB、IκB-α表达及核蛋白NF-κB转位情况。**结果** 野生型小鼠致伤后肝脏总蛋白中NF-κB各时相点除伤后6 h有所下降外($P<0.05$),其余相差不显著,而SRC-3基因敲除小鼠致伤后肝脏总蛋白中NF-κB有增加的趋势;野生型小鼠致伤后肝脏NF-κB核转位明显增加($P<0.01$),6 h达到峰值,而SRC-3基因敲除小鼠致伤后肝脏NF-κB核转位亦有所增加,但明显低于野生型小鼠($P<0.01$);野生型小鼠致伤后肝脏总蛋白中IκB-α表达变化不明显($P>0.05$),而SRC-3基因敲除小鼠致伤后肝脏总蛋白中IκB-α表达伤后1 h明显下降($P<0.01$),之后均高于正常($P<0.01$)。**结论** 严重创伤后SRC-3基因敲除小鼠NF-κB的表达及核转位与野生型小鼠有明显的差异,SRC-3的缺失可能部分抑制了NF-κB对创伤应激的调控作用。

关键词: 类固醇受体辅活化子-3;核因子κB;基因敲除
中图法分类号: R322.47;R392.13;R644.02 **文献标识码:** A

Effect of burn injury on expression and nuclear translocation of NF-κB in SRC-3 knock out mice

DU Zhi-yong[1], SU Yong-ping[1], XU Jian-ming[2], LIAO Lan[2], Ran Xin-ze[1], LI Jun[1], WANG Feng-chao[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; [2]Department of Molecular Biology, Baylor College of medicine, Houston, Texas, 77030)

Abstract: Objective To study the effect of burn injury on expression and nuclear translocation of NF-κB in SRC-3 knock out mice. **Methods** SRC-3 knock out mice and wild-type mice are included as experiment group and control group respectively according to their genotype. The difference of expression of NF-κB and IκB-α in total hepatic protein extract and nuclear translocation of NF-κB in nuclear extract between the two groups were investigated before burn, 1 h, 6 h and 12 h after burn. **Results** The NF-κB expression in total hepatic protein extract did not change significantly except some decline 6 h after burn in wild-type mice, whereas an increase trend of NF-κB expression was observed in SRC-3 knock out mice. Although the nuclear translocation of NF-κB P50 were all increased in two groups after burn, but the quantity of NF-κB in nuclear extract was more higher in wild-type mice than that in SRC-3 knock out mice. The IκB-α expression did not change significantly in wild mice after burn, whereas an increase trend was observed in SRC-3 knock out mice except significant decline 1 h after burn. **Conclusion** There exists significant differences of NF-κB expression and nuclear translocation after burn injury between wild-type mice and SRC-3 knock out mice. The role of NF-κB in trauma and inflammation may be impaired in SRC-3 deficient mice.

Key words: steroid receptor coactivator-3; NF-κB; gene knock out

严重烧伤使机体产生强烈的应激反应,而早期炎症反应又在机体应激反应过程中发挥重要作用。大量的研究资料表明,NF-κB和AP-1是体内促进炎症发生和发展的关键因子,它们共同参与了多种炎症介质的合成,如TNF-α、IL-1β、IL-6等[1,2]。这些炎症介质除了激发炎症反应外还能够通过兴奋HPA轴激活以GC及其受体GR为主的抗炎体系。因此,GR与NF-κB和AP-1之间的相互作用是机体调控炎症反应的重要分

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054201);海外青年学者合作研究基金资助项目(30328025)
Supported by the National Key Basic Development and Plan of China ("973" Projects, G1999054201) and the National Natural Science Foundation of China-Joint Research Fund for Overseas Chinese Young Scholars (30328025)
作者简介:杜智勇(1971-),男,河南省开封市人,博士研究生,主治医师,主要从事创伤应激方面的研究,现在新桥医院麻醉科工作。电话:(023)68774682
通讯作者:粟永萍,电话:(023)68752009
收稿日期:2005-07-04;修回日期:2005-09-30

子基础。而 SRC-3 除了对核受体家族具有辅活化作用外还可以明显促进 NF-κB 的转录活性，缺失 SRC-3 很可能对 NF-κB 转录激活功能产生明显影响。因此本研究以此为出发点，以 SRC-3 基因敲除小鼠为研究对象探寻严重创伤对 SRC-3 缺陷小鼠的 NF-κB 的表达和核转位以及 NF-κB 的抑制因子 IκB-α 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SRC-3 杂合子小鼠(SRC-3$^{+/-}$)由美国贝勒医学院引进，在我所层流动物房内进行饲养和繁殖以获得 SRC-3 基因敲除纯合子。

1.2 小鼠的基因型鉴定

具体操作见文献[3]。野生型小鼠用作对照组，SRC-3 基因敲除小鼠用作实验组。

1.3 动物模型的建立及标本的提取

1.3.1 15% ~20% TBSAⅢ度烧伤模型 小鼠体质量(20 ± 5) g，雌雄不拘。分为 SRC-3$^{+/+}$未致伤，SRC-3$^{+/+}$致伤 1、6、12 h 组以及 SRC-3$^{-/-}$未致伤，SRC-3$^{-/-}$致伤 1、6、12 h 组，每组 5 只。背部剪毛并确定致伤面积(体表面积的 15% ~20%)，除未致伤组外，其余小鼠以凝固汽油涂抹拟致伤部位，点燃汽油后致伤 7 ~8 s，背部以碘氟涂抹抗感染，腹腔补液(生理盐水 100 ml/kg)后放入笼中自由摄食。

1.3.2 标本采集及处理 分别于伤前、伤后 1、6、12 h 将小鼠处死后提取肝脏组织标本，放入液氮中保存，待总蛋白和核蛋白提取。

1.3.3 肝脏总蛋白提取 取约 100 mg 肝脏组织，加入 PIERCE 公司的 T-PER 总蛋白提取液 1 ~2 ml 后于玻璃匀浆器中匀浆，10 000 r/min 离心 5 min 后收集上清，Bradford 法测定蛋白含量后，分装并于 -70 ℃保存备用。

1.3.4 肝脏核蛋白提取 取肝组织 100 mg，加入 1 ml 裂解缓冲液 A(10 mmol/L Hepes pH 7.9，10 mmol/L KCl，0.1 mmol/L EDTA，0.1 mmol/L EGTA，1% NP-40，1 mmol/L DTT，0.5 mmol/L PMSF)冰浴中匀浆，4 ℃ 12 000 × g 离心 10 min，弃上清，再加入不含 NP-40 的裂解液 A 1.5 ml，混匀后冰浴中放置 10 min，4 ℃ 12 000 × g 离心 10 min，弃上清，再加入 100 μl 裂解液 B(20 mmol/L Hepes pH 7.9，0.4 mol/L NaCl，1 mmol/L EDTA，1 mmol/L EGTA，1 mmol/L DTT，1 mmol/L PMSF)，冰浴中放置 30 min，4 ℃ 12 000 × g 离心 10 min，提取上清，Bradford 法测定蛋白含量后，分装并于 -70 ℃保存备用。

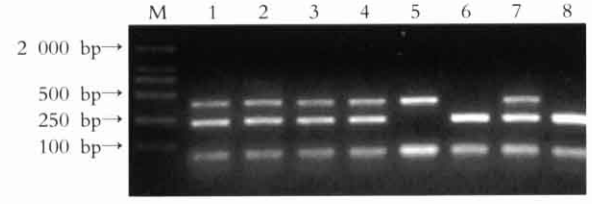
1.4 Western blot 分析

实验所用一抗为 NF-κB p50(sc-1192)、IκB-a(sc-22264-R)，由 Santa Cruz 公司订购，二抗由中山公司订购。按常规方法行 SDS-PAGE 电泳，每个加样孔上 40 μg 蛋白量(加样前蛋白需变性)，电泳完毕后采用半干转印法将蛋白转入 PVDF 膜上，封闭后加入相应的一抗(1∶500)、二抗(1∶2 000 ~3 000)行 Western blot 分析，样本为已知浓度的 3 只小鼠肝脏总蛋白或核蛋白等量混合所得，结果重复 2 次。

2 结果

2.1 小鼠鉴定情况示意图

图 1 中出现 450 bp 条带的为野生型小鼠；出现 230 bp 条带的为基因敲除纯合子小鼠；出现 230 bp 和 450 bp 条带的为杂合子小鼠。

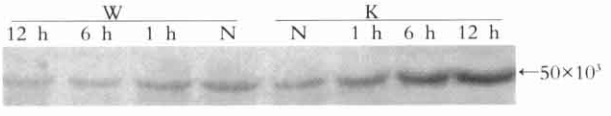


M：标准 DL2000；1 -8：小鼠编号

图 1 小鼠鉴定结果示意图

2.2 肝脏总蛋白 NF-κB p50(分子量 50 × 10^3)、IκB-α(分子量 40 × 10^3) Western blot 结果

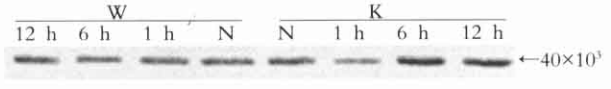
图 2 显示致伤后野生型小鼠肝脏总蛋白 NF-κB p50 表达有下降趋势，而 SRC-3$^{-/-}$小鼠肝脏总蛋白 NF-κB p50 表达有增加趋势(P <0.01)。



W：野生型小鼠；K：基因敲除小鼠；N：未致伤组

图 2 肝脏总蛋白 NF-κB p50 Western blot 结果

图 3 显示致伤后野生型小鼠肝脏总蛋白 IκB-α 表达变化不显著，而 SRC-3$^{-/-}$小鼠肝脏总蛋白 IκB-α 1 h 明显下降(P < 0.01)，之后表达明显增加(P <0.01)。

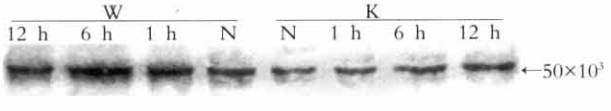


W：野生型小鼠；K：基因敲除小鼠；N：未致伤组

图 3 肝脏总蛋白 IκB-α Western blot 结果

2.3 肝脏核蛋白 NF-κB p50 Western blot 结果

图 4 显示致伤后野生型小鼠肝脏 NF-κB 入核明显增加(P <0.01)，而 SRC-3$^{-/-}$小鼠肝脏 NF-κB 入核有所增加，但明显低于野生型小鼠(P <0.01)。



W：野生型小鼠；K：基因敲除小鼠；N：未致伤组

图 4 肝脏核蛋白 NF-κB p50 Western blot 结果

3 讨论

NF-κB 是一个转录因子，其通过对特定基因的调控在细胞分化、增殖、凋亡、炎症反应以及免疫反应中具有举足轻重的作用。通常情况下，NF-κB 是与抑制蛋白 IκB 结合在一起的，当外界刺激使 NF-κB 激活时，首先由 IκB 激酶(IKK)促使 IκB 降解，使 NF-κB 释放出来并进入核内，与 DNA 结合，调控目标基因转

录[4,5]。而 SRC 家族主要作用是促进或抑制核受体(NR)介导的基因转录，包括 SRC-1、SRC-2、SRC-3[6]。由于 NR 和 NF-κB 在基因调控中具有举足轻重的作用，同时大量的研究已证实了 GR 和 NF-κB 之间的相互拮抗作用以及 GR 和 NF-κB 两条信号通路之间共用一些辅调节蛋白[7,8]。更为重要的是，部分研究资料表明 SRC-1、SRC-3 以及 CBP 都能够与 NF-κB 发生作用并促进后者的转录活性[9,10]。由于 NF-κB 在免疫及炎症反应中具有重要作用，所以 SRC 家族亦可能在 NF-κB 介导的炎症反应中发挥作用，而烧伤作为一种严重创伤，早期即产生明显的炎症反应，SRC-3 的缺失是否会通过影响 NF-κB 的功能进而进一步影响 NF-κB 介导的炎症反应目前还不得而知，亦少见国内外相关文献报道。

通过本研究表明，致伤后野生型小鼠肝脏总蛋白 NF-κB 表达有所下降，而 SRC-3 基因敲除小鼠 NF-κB p50 的表达则是增加的，究其原因可能是由于 SRC-3$^{-/-}$小鼠缺乏 SRC-3 蛋白，丧失了 SRC-3 对 NF-κB 的辅活化作用，NF-κB 的功能受到抑制，机体通过代偿作用调高了 NF-κB 的表达，而对于野生型小鼠，具有正常的 SRC-3 对 NF-κB 的辅活化作用，NF-κB 功能能够得到有效的发挥，所以 NF-κB 的表达并未上调，甚至可能由于蛋白水解活性的增强有所下降。值得一提的是，在我们的研究中虽然 SRC-3$^{-/-}$小鼠肝脏总蛋白 NF-κB 表达明显增加，但 NF-κB 的入核情况明显不如野生型小鼠，说明 NF-κB 的核转位在 SRC-3 缺陷小鼠发生了明显的障碍。造成这种状况的原因可能是 NF-κB 由细胞质入核发生了障碍也可能是已入核的 NF-κB 由核内清除加速。我们知道，在 NF-κB 通路的活化中，IKK 的活性起着至关重要的作用，它促使 IκB-α 降解，使 NF-κB 摆脱 IκB-α 的抑制从而进入核内，调节基因转录。最近有研究表明，IKK 与 SRC-3 具有密切的联系，IKK 能够通过 SRC-3 的磷酸化作用极大的促进 NF-κB 介导的基因转录，缺乏 SRC-3 蛋白，NF-κB 的转录活性明显下降[9,10]。所以我们推测可能是同属胞浆蛋白的 SRC-3 通过某种方式促进了 NF-κB 向核内转运或 SRC-3 磷酸化入核后与 NF-κB 形成了稳定的复合物，减少了后者降解，而 SRC-3$^{-/-}$小鼠正是由于缺乏 SRC-3 蛋白，导致核内 NF-κB 明显低于野生型小鼠。

IκB-α 作为 NF-κB 的抑制因子，其作用是将 NF-κB 限制在细胞质内。本实验显示 SRC-3$^{-/-}$IκB-α 蛋白虽在伤后 1 h 明显下降，但在后期却明显增加，而野生型小鼠 IκB-α 蛋白变化并不显著。在通常情况下，刺激信号激活 IKK，IKK 使 IκB 蛋白发生磷酸化促使后者降解，释放 NF-κB 入核，NF-κB 入核后反过来又促进 IκB-α 的基因转录，上调 IκB-α 的表达，形成负反馈机制[5]。所以在野生型小鼠我们没有观察到 IκB-α 的明显变化，但在 SRC-3 缺陷小鼠 IκB-α 早期明显下降，后期明显增加，这可能与以下因素有关：①IκB-α 早期下降可能是由于缺乏 SRC-3 后，NF-κB 入核障碍减弱了对 IκB-α 反馈调节作用，IκB-α 出现一过性下降。②GR 与 NF-κB 之间具有相互拮抗作用[11]，SRC-3 缺乏导致 NF-κB 功能受到抑制，减弱了其对 GR 的抑制作用，而 GR 能够上调 IκB-α 的表达[12]。

通过以上分析，我们认为 SRC-3 蛋白缺失使 NF-κB 发生了明显的核转运障碍，入核障碍或入核后无法形成稳定复合物必定影响其功能的发挥，从而导致其在调控炎症反应的功能发生障碍。

参考文献：

[1] DE-BOSSCHER K, VANDEN-BERGHE W, HAEGEMAN G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression[J]. Endocr Rev, 2003, 24(4): 488 - 522.

[2] TAK P P, FIRESTEIN G S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases[J]. J Clin Invest, 2001, 107(1): 7 - 11.

[3] 杜智勇，粟永萍. SRC-3 基因敲除小鼠的饲养繁殖及鉴定[J]. 第三军医大学学报，2005，27(5)：373 - 375.

[4] JIJON H, ALLARD B, JOBIN C. NF-kappaB inducing kinase activates NF-kappaB transcriptional activity independently of IkappaB kinase gamma through a p38 MAPK-dependent RelA phosphorylation pathway[J]. Cell Signal, 2004, 16(9): 1023 - 1032.

[5] TING A Y, ENDY D. Signal transduction. Decoding NF-kappaB signaling[J]. Science, 2002, 298 (5596): 1189 - 1190.

[6] TORCHIA J, ROSE D W, INOSTROZA J, *et al*. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function[J]. Nature , 1997, 387(6634): 677 - 684.

[7] BLADH L G, LIDEN J, DAHLMAN-WRIGHT K, *et al*. Identification of endogenous glucocorticoid repressed genes differentially regulated by a glucocorticoid receptor mutant able to separate between nuclear factor-kappaB and activator protein-1 repression[J]. Mol Pharmacol, 2005, 67(3): 815 - 826.

[8] SMOAK K A, CIDLOWSKI J A. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation[J]. Mech Ageing Dev, 2004 , 125(10-11): 697 - 706.

[9] NA S Y, LEE S K, HAN S J, *et al*. Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations[J]. J Biol Chem, 1998, 273(18): 10831 - 10834.

[10] WU R C, QIN J, HASHIMOTO Y, *et al*. Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(10): 3549 - 3561.

[11] NELSON G, WILDE G J, SPILLER D G, *et al*. NF-kappaB signalling is inhibited by glucocorticoid receptor and STAT6 *via* distinct mechanisms[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 12): 2495 - 2503.

[12] BLADH L G, LIDEN J, PAZIRANDEH A, *et al*. Identification of target genes involved in the antiproliferative effect of glucocorticoids reveals a role for nuclear factor-(kappa)B repression[J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(3): 632 - 643.

（编辑　陈聪连）