文章编号:1000-5404(2007)01-0051-02

论著

NF-κB P65在大鼠异种心脏移植后心肌中的表达及意义

杨光伦,姚榛祥,黄 平,涂 刚 (重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016)

提 要:目的 复制小鼠→大鼠异种心脏移植模型,探讨核转录因子κB(nuclear factor-κB,NF-κB)P65蛋白在异种移植心肌中的表达及NF-κB的DNA结合活性。**方法** 动物随机数字法分成2组:A组(对照组),$n=6$;B组(移植组),$n=6$。采用免疫印迹杂交法(Western blot)检测对照组及移植组心肌组织NF-κB P65表达,凝胶电泳迁移率实验检测NF-κB DNA结合活性。**结果** 移植组的NF-κB P65蛋白表达和NF-κB DNA结合活性均显著高于对照组($P<0.05$)。**结论** NF-κB的激活可能在大鼠异种移植心脏排斥反应中起着重要作用。

关键词: 异种移植;NF-κB
中图法分类号: R-332; R392.4; R654.2 **文献标识码:** A

Expression of NF-κB P65 in mouse to rat cardiac xenograft model

YANG Guang-lun, YAO Zhen-xiang, HUANG Ping, TU Gang (Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To reproduce mouse to rat heart transplantation model and determine the expression and DNA binding activity of NF-κB P65 in xenograft heart. Methods Six NIH mice were used as heart donors and six Wistar rats as heart recipients. After the transplantation, the transplanted hearts without any drug intervention were prepared for experiment after cardiac arrest. The hearts from another six NIH mice served as normal controls. The expression of NF-κB P65 protein and NF-κB P65 DNA binding activity in xenograft heart were determined by Western blotting and electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Results The expression level of NF-κB P65 and NF-κB P65 DNA binding activity in transplanted hearts were higher than control hearts ($P<0.05$). Conclusion NF-κB may play an important role in mouse to rat heart transplantation.

Key words: xenotransplantation; NF-κB

延迟性异种移植排斥反应(delayed xenograft rejection, DXR)是异种移植仍未突破的瓶颈,其发生机制目前还不十分清楚。本研究利用小鼠→大鼠异种心脏移植的DXR动物模型,探讨NF-κB P65在移植物中的表达及NF-κB的激活情况,以阐明NF-κB在异种移植DXR中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

供体选用雄性NIH小鼠,体质量20~25 g。受体选用Wistar大鼠,体质量250~300 g,其中供体NIH小鼠12只,受体Wistar大鼠6只,60~90 d日龄,均由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 心脏移植

采用改良袖套法把供心升主动脉和肺动脉分别与受体右颈总动脉和右颈外静脉端端吻合[1]。移植成功后每天在颈部触摸移植心脏跳动,以心跳停止作为排斥反应发生的时间,并经病理证实。

1.3 实验分组

本实验共分2组:A组为空白对照组($n=6$),心脏直接取自健康NIH小鼠;B组为移植组,供体选用雄性NIH小鼠($n=6$),受体选用Wistar大鼠($n=6$),移植成功后不给任何药物干预,移植心脏停止搏动后立即将标本置于液氮保存,并行常规病理检查。

1.4 Western blot检测移植组及空白对照组心肌组织NF-κB P65表达

整个过程分4步:①细胞总蛋白的提取;②SDS凝胶电泳;③电转;④抗体孵育和显色。抗P65多克隆抗体(兔抗鼠)购自美国Santa Curz公司。

1.5 凝胶电泳迁移率实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)检测NF-κB DNA结合活性

整个过程分3步:① 细胞核蛋白的提取。②NF-κB探针标记。③EMSA电泳。抗P65多克隆抗体(兔抗鼠)购自美国Santua Cruz公司;[γ-^{32}P]ATP(370 MBq/ml)购自北京亚辉公司;T_4多核苷酸激酶和NF-κB探针购自美国Promega公司,探针序列为:5′-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3′;3′-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5′。

基金项目: 重庆市卫生局科研课题(05-2-180)
Supported by the Scientific Research Project of Bureau of Public Health of Chongqing (05-2-180)

作者简介: 杨光伦(1963-),重庆市人,博士,副主任医师,主要从事普通外科基础疾病及器官移植方面的研究。电话:(023)89011191,E-mail:guanglunyang@163.com

收稿日期: 2006-07-05;**修回日期:** 2006-10-24

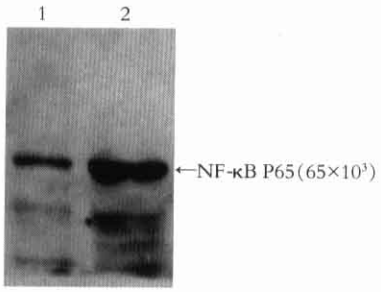
1.6 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 移植心肌组织中 NF-κB P65 蛋白的表达

移植组积分光密度值为(80.35±4.62)，正常心肌对照组积分光密度值为(21.75±2.08)，移植组心肌 NF-κB P65 表达量显著高于对照组($P<0.05$)。结果见图1。

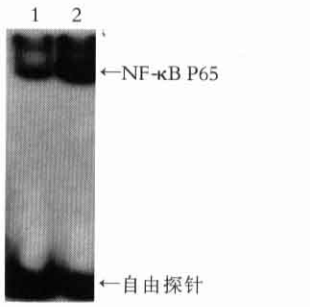


1：正常心肌组织；2：移植后心肌组织

图1 心肌 NF-κB P65 蛋白表达

2.2 移植心肌组织中 NF-κB DNA 结合活性

移植组积分光密度值为(183.59±6.09)，正常对照组积分光密度值为(73.86±9.50)，移植组心肌组织中 NF-κB DNA 结合活性明显高于对照组($P<0.05$)。结果见图2。



1：正常心肌组织；2：移植后心肌组织

图2 心肌 NF-κB DNA 结合活性

3 讨论

NF-κB 作为转录因子在多种细胞中都有表达。其家族成员包括：Rel(c-Rel)、RelA(p65)、RelB、NF-κB1(p50/p105)、NF-κB2(p52/p100)。在一般情况下以同源或异源二聚体的形式组成复合体再与其抑制蛋白 IκB 结合滞留于细胞质中，当细胞受到外源刺激通过信号传导使 IκB 发生降解，NF-κB 则进入细胞核与 DNA 特定靶 κB 部位结合，调控特定基因转录。激活的 NF-κB 从细胞质向胞核移位，并不停地穿梭于核质之间[2]。NF-κB 调控着在获得性免疫反应起重要作用的基因的表达，如 MHC 蛋白、IL-2、IL-12、IFN-β 等细胞因子，NF-κB 是整个免疫反应的中，同时 NF-κB 还能激活 c-IAP-1、c-IAP-2、A1(Bfl1)、Bcl-XL、Fas 配体、c-myc 和周期素等涉及细胞凋亡和细胞增殖调节相关基因的表达，因而 NF-κB 在细胞凋亡过程中也起着关键作用[3]。

在健康的血管，内皮细胞形成一个屏障来阻止蛋白漏出和细胞进入间质并维持血管的抗凝环境以防止血管内凝血，在同种移植和异种移植排斥反应时，内皮细胞(EC)改变其表型，其屏障功能将减弱，使细胞黏附、移位、促凝和血栓形成，这些变化就是 EC 激活的表现。EC 激活的表现很大程度上都是基于黏附分子(E-选择素、VCAM-1、ICAM-1、P-选择素)，细胞因子(IL-1、IL-5、IL-8)，促血栓分子(组织因子，TF)，纤维蛋白溶解酶原激活抑制剂等诱导所致。EC 激活是 DXR 的病理基础[4]。诱导 EC 基因表达主要在转录水平调节，且不依赖蛋白合成。因此，这些基因的早期诱导需要先存转录因子的作用，诱导 EC 作用的这些基因的调节区域序列分析，显示它们都至少享用一个事先存在的 NF-κB 转录因子结合位点。这些提示在诱导上调 EC 激活的内源性基因中 NF-κB 起着重要作用[5]。在同种移植中抑制 NF-κB 的表达可延长移植物的存活时间[6]，但在异种移植中少见相关文献报道。

本研究涉及 NF-κB 家族中重要组成成员 P65，表明 NF-κB 在细胞中最常见的形式是 P65 及 P50 组成的异源二聚体。本研究采用 Western blot 证实 6 只小鼠→大鼠心脏移植排斥中心脏 P65 的表达较空白对照组小鼠心肌显著增高。EMSA 分析了 NF-κB 在移植心肌中的 DNA 结合活性，结果显示其在移植心肌中的活化水平也显著高于对照组心肌的水平，说明 NF-κB 的活化在移植心肌的 DXR 中起着重要的作用。

我们的实验证实 NF-κB 在小鼠→大鼠心脏移植排斥中，NF-κB 的基础表达及其 DNA 结合活性均增高，NF-κB 在 DXR 的发生发展中起作重要作用，它可能成为异种移植控制 DXR 的新靶点。

参考文献：

[1] 杨光伦，罗诗樵，姚榛祥. 改良袖套法建立异种心脏颈部移植模型[J]. 重庆医科大学学报，2004，29(1)：64-65.

[2] Zhong H, May M J, Jimi E, *et al*. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1[J]. Mol Cell, 2002, 9(3): 625-636.

[3] Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death[J]. Nat Immunol, 2002, 3(3): 221-227.

[4] Bach F H, Robson S C, Ferran C, *et al*. Endothelial cell activation and thromboregulation during xenograft rejection[J]. Immunol Rev, 1994, 141: 5-30.

[5] Ferran C, Millan M T, Csizmadia V, *et al*. Inhibition of NF-kappa B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 214(1): 212-223.

[6] Tiao M M, Lu L, Tao R, *et al*. Prolongation of cardiac allograft survival by systemic administration of immature recipient dendritic cells deficient in NF-kappaB activity[J]. Ann Surg, 2005, 241(3): 497-505.

(编辑 薛国文)