DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.02.018

论著

文章编号:1000-5404(2004)02-0128-03

NF-κB参与小鼠β-防御素3基因急性时相表达的转录调节

杨卫华,周建新,钟小林,廖荣霞 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 分析急性时相反应时调节小鼠β-防御素3基因表达的转录因子。方法 通过腹腔注射外源性脂多糖(LPS)建立小鼠急性时相反应,经Northern blot方法检测mBD3mRNA在组织中的表达;EMSA和Southwestern blot分析细胞核蛋白中的转录因子。结果 内毒素注射后仅在肝脏组织中检测到mBD3mRNA;肝脏细胞核蛋白中有与mBD3基因调节区特异DNA片段结合的转录因子,分子量在(43.0~66.2)×10^3之间。结论 小鼠急性时相反应时NF-κB参与β-防御素3基因在肝脏中表达的转录调节。

关键词:NF-κB;β-防御素;急性时相反应;转录调节

中图法分类号:R392.11;R392.13 文献标识码:A

NF-κB is involved in the transcriptional regulation of mouse β-defensin-3 gene expression during acute phase response

YANG Wei-hua, ZHOU Jian-xin, ZHONG Xiao-lin, LIAO Rong-xia (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the transcription factors that regulate the mouse β-defensin-3 gene expression during the systemic acute phase response. **Methods** Murine systemic acute phase response model was established by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS). The expression levels of the mouse β-defensin-3 mRNA in different tissues were detected by Northern blotting. The transcription factors binding to the 5′ flanking sequence of mBD3 gene were analyzed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and Southwestern blotting. **Results** After LPS injection, the expression of mBD3 gene was detected only in the mouse liver, but not in the heart, lung, spleen, and kidney. The results of EMSA showed the obvious retardant bands, suggesting that some proteins in the nuclei could bind to the specific DNA sequence of mBD3 gene. The molecular mass of this DNA binding protein was between (43.0—66.2)×10^3 assessed by Southwestern blotting. **Conclusion** NF-κB is involved in the transcriptional regulation of the mouse β-defensin-3 gene when hepatic acute phase response occurs.

Key words: NF-κB; β-defensin; acute phase response; transcriptional regulation

抗菌肽作为机体先天免疫系统的组成部分,在特定的组织细胞中既可以是组成性表达,又可在疾病状态下或不同因素的刺激下诱导表达。在机体急性时相反应时各种抗菌肽的表达是目前研究抗菌肽基因诱导表达的主要方法,可能有多种细胞受体、转录因子参与并通过不同的信号途径进行调节,而且这些信号途径在昆虫和哺乳动物体内相同,提示机体先天免疫应答在进化过程中的保守性。本实验通过内毒素刺激小鼠产生急性时相反应诱导mBD3基因的表达,对参与mBD3基因的表达的转录因子进行分析,为进一步研究抗菌肽基因的诱导表达及调节打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

健康昆明小鼠24只,雌雄不拘,体质量(20±2) g。cDNA探针:5′-actccacaactgccaatctgacga-3′(mBD3cDNA 145~169 bp)。NF-κB结合序列:5′-tggggatcctcacatt-3′(有意义链;mBD3基因调节区-167~-179 bp)。探针由上海生工生物工程公司合成。同位素标记物:[γ-^{32}P]-ATP 10 mCi/ml、[α-^{32}P]-dCTP 10 mCi/ml北京亚辉生物医学公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠急性时相反应的建立 实验动物随机分为二组:正常组(n=7),实验组(n=27)。实验组小鼠腹腔注射LPS 1.5 μg/g诱导急性时相反应。对照组腹腔注射生理盐水。

1.2.2 总RNA提取、测定 采用异硫氰酸胍法提取各组织总RNA,分光光度法测定浓度[9]。

作者简介:杨卫华(1971-),男,湖北省仙桃市人,硕士研究生,助理研究员,主要从事真核生物基因表达调控方面的研究。电话:(023)68752261

通信作者:周建新,电话:(023)68752261

收稿日期:2003-01-20;修回日期:2003-10-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.3　肝脏细胞核蛋白提取、测定　　核蛋白提取: LPS 注射后 8 h 脱颈椎处死小鼠, 立即剖腹取出肝脏, 浸于肝洗液中, 洗去血污。以每克肝组织加预冷低渗液 10 ml, 压碎, 过滤, 滤液置于匀浆器中匀浆。肝匀浆 4 ℃, 900× g 离心 5 min。弃去上清, 沉淀的核加核裂解液 3 ml, 4℃磁力搅拌 20 min; 30 000× g 4 ℃ 离心 20 min, 去沉淀。每毫升上清加固体硫酸铵 0.33 g, 缓慢溶解 15~20 min, 置冰上放置 30 min, 30 000× g 4 ℃ 离心 20 min, 沉淀蛋白质。沉淀的蛋白质溶于 2 ml 核蛋白透析液, 并对此透析液透析过夜, 20 000× g, 4 ℃离心 10 min, 去除不溶蛋白。取上清置－20 ℃保存。蛋白定量按 Lorry 法进行测定后以 50 μg/管分装, －20 ℃保存。

1.2.4　探针标记, 纯化及比活性测定　　cDNA 探针标记: 采用 T4 多核苷酸激酶末端标记法。双链寡核苷酸探针标记: 采用 3′ 末端填平标记法。标记探针纯化: 采用 Sephadex-G50 柱层析法[9]。探针比放射活性测定: 取收集各管流出液 1 μl, 点样在滤纸片上, 干燥后, 置于含闪烁液的闪烁瓶中, 送西南医院同位素室测定。

1.2.5　Northem-blot 分析　　总 RNA 按前述方法提取后, 行 0.9% 琼脂糖-甲醛变性胶电泳。样品 RNA 每孔 20 μg, 电压 100 V, 电泳 1 h。电泳完毕后将 RNA 转移到尼龙膜上。在 20× SSC 中漂洗去掉膜上的凝胶, 晾干后 80 ℃烘烤 2 h。将膜置于杂交袋中, 加入杂交液, 42 ℃水浴中预杂交 3 h。杂交完毕后, 于暗盒内压上两张 X 线片, 置－70 ℃放射显影 24~48 h。同时紫外灯下观察凝胶, 检查凝胶中 RNA 转移效率。EB 染色的 18 sRNA 作为内参照。

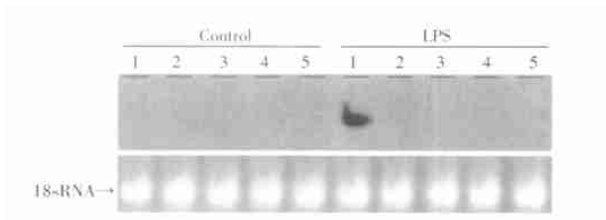
1.2.6　电泳迁移率改变实验　　取核蛋白 50 μg 加入含有 10 μg/ml 变性鲑精 DNA 的 10× 结合缓冲液 5 μl, 室温反应 10 min。然后加入标记 DNA 1 μl, 加水至 50 μl, 室温反应 30 min 至 1 h, TBE(45 mmol/L Tris-硼酸, 2 mmol/L EDTA)作电泳缓冲液, 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 120 V 电压, 电泳 2~3 h。电泳完毕后, 揭下凝胶, 置干胶机上凝胶干燥, 放射自显影 24~48 h。未标记的特异 DNA 片段和非特异的 DNA 片段(NF-κB 结合序列突变体 5′-agcttttttctcatttttcccagcctcat-3′有意义链)各 1 μl 作竞争性抑制对照。

1.2.7　South-western blot 分析　　取核蛋白 50 μg 在 1× SDS 载样缓冲液中加热煮沸 3 min。蛋白质分子量(中分子量)标准参照物按同样方法变性。然后上样于制备好的 9% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中, 在 Tris-甘氨酸电泳缓冲液中(pH 8.3), 150 V 电泳 2 h。电泳完毕后取下凝胶, 切下蛋白标准, 考马斯亮蓝染色。其余部分凝胶在去离子水中稍漂洗后, 电转移方法(0.2 A, 转移8 h)将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。转移结束后, 取出转移膜稍晾干后置于杂交袋中。加入 2 ml 杂交缓冲液, 室温下预杂交 2 h, 然后加入标记探针(10 cpm/孔), 室温下杂交 3 h。杂交完毕, 取出硝酸纤维素膜, －70 ℃放射显影 24~72 h。

2　结果

2.1　小鼠β-防御素-3(mBD3)mRNA 在组织中的诱导表达

小鼠腹腔注射内毒素 1.5 μg/g 诱导急性时相反应, 8 h 后处死。取新鲜肝、心、肺、肾、脾, 提取各组织总 RNA。对照组小鼠腹腔注射无菌生理盐水。[γ-^{32}P] ATP 标记 mBD3 基因一段含 24 bp 的 cDNA 序列为探针, 与转移到膜上的 RNA 杂交。结果仅在 LPS 注射的小鼠肝脏组织中检测到 mBD3 mRNA 的表达, 对照组各组织及实验组心、肺、肾、脾组织中未检测到, 见图 1。



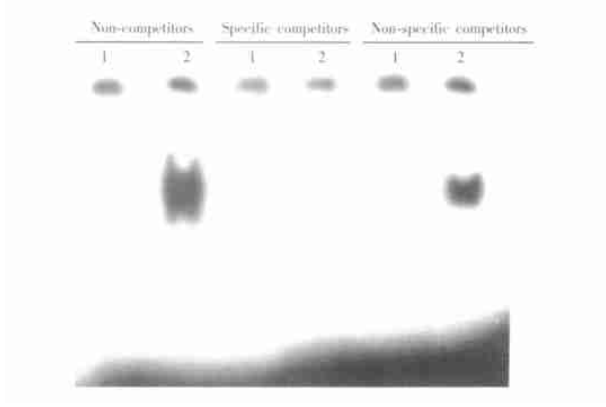
1: Total RNA from the liver; 2: Total RNA from the lung; 3: Total RNA from the heart; 4: Total RNA from the kidney; 5: Total RNA from the spleen

图 1　LPS 刺激后 Northern blot 方法检测小鼠各组织中 mBD3 mRNA

Fig 1　Analysis of mBD3 expression in tissues by Northern blotting

2.2　参与 mBD3 基因诱导表达调节的 DNA 结合蛋白分析

以 mBD3 基因启动子一段含 17 bp 双链寡核苷酸序列为探针, 分析发现此序列可能为 NF-κB 的结合位点。经[α-^{32}P] dCTP 标记后与肝脏组织细胞核蛋白反应。结果见 LPS 1.5 μg/g 注射后提取的肝脏组织细胞核蛋白中存在有与此 DNA 序列结合的转录因子, 因而形成明显的较游离探针滞后的放射自显影带。加入过量的未标记的特异 DNA 探针作竞争抑制对照, 滞后带消失, 而加入非特异的 DNA 片段滞后带无影响。说明此转录因子与探针序列的结合是特异的, 见图 2。



1: Control; 2: LPS-injected group. Non-labelled probes were used as specific competitors; Non-specific DNA fragments were used as non-specific competitors

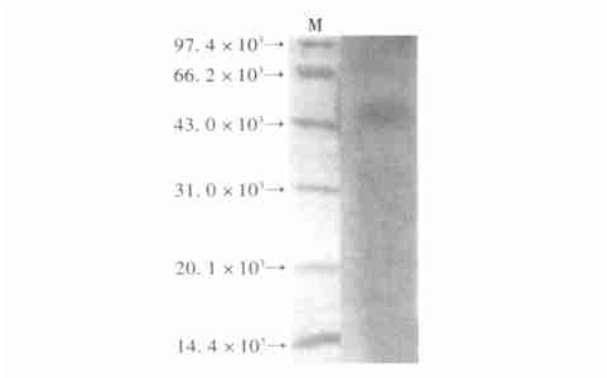
图 2　EMSA 结果显示肝脏组织核蛋白中转录因子与 DNA 序列结合形成滞后带

Fig 2　Analysis of the nuclear protein of liver binding to the regulation sequence of mBD3 gene by EMSA

LPS 1.5 μg/g 的剂量刺激后核蛋白经 9%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转膜, 进行 South-western blot 分析。与蛋白质标准

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

对比。可见此 DNA 结合蛋白的分子量在(43.0～66.2)× 10^3 之间，见图 3。



M：Protein marker

图 3 LPS 刺激后肝脏组织核蛋白 South western blot 结果

Fig 3 Result of the molecular mass of the DNA binding protein by Southwestern blotting

3 讨论

正常情况下 mBD3 主要表达于舌、气管和食道等器官的上皮细胞中，在肝、肺、小肠等组织中因检测方法不同而出现微弱表达或者不表达[1,2]。本实验以 mBD3 基因 146～169 bp cDNA 序列设计合成一段寡核苷酸探针，经[γ-^{32}P]-ATP 标记后，采用 Northern blot 方法检测了正常小鼠(腹腔注射生理盐水)和以 1.5 μg/g 体重 LPS 诱导的小鼠心、肝、肺、肾、脾组织中 mBD3mRNA 的表达。在正常小鼠的组织中都未能检测出 mBD3mRNA 的表达，而 LPS 诱导的小鼠各组织中，仅在肝脏中出现阳性结果(图 1)。Bals 等[1]采用 RT-PCR 方法来检测时，在正常小鼠的肝脏中未能检测到 mBD3 基因的表达，但在肺部感染的小鼠肝脏组织中出现阳性结果，证实了无论是在局部感染还是在非特异性的刺激下，mBD3 作为急性时相反应物在肝脏中其 mRNA 的表达是上调的。

NF-κB 最初在 B 淋巴细胞核内作为一个转录因子被发现，调节免疫球蛋白基因的表达[3]。现在已发现越来越多的基因启动子序列含有 NF-κB 结合位点，也已证实 NF-κB 参与这些基因的转录调控[4]。分析 mBD3 基因启动子序列，在-167～-177 bp 处有 NF-κB 可能的结合位点，以此序列合成探针进行电泳迁移率改变实验(EMSA)，结果表明在肝脏组织细胞核内存在与此序列特异结合的转录因子；进一步经 South-western blot 分析分子量为(44.0～66.2)× 10^3，证实此 DNA 结合蛋白为 NF-κB，表明 NF-κB 参与 mBD3 基因的诱导表达。

在对人和鼠两种动物的急性时相应答的研究中发现 LPS 诱导的急性时相反应有多种转录因子参与基因的转录调节。其中研究得最为深入的是与 IL-6 应答元件(IL-6RE)相结合的转录因子[5,6]。包括 NF-IL-6、LAP、NF-IL-6β、IL-6RE 结合因子和急性时相应答因子(APRF)。一些抗菌肽基因启动子区序列也含有这些转录因子的结合位点，在抗菌肽基因的诱导表达中单独或协同调节基因转录[7,8]。也有报道说在 mBD3 基因启动子序列上还含有 NF-IL-6、IFN-γ 结合的同源序列[1]，但 NF-IL-6，IFN-γ 是否参与 mBD3 基因的急性时相相关表达以及 NF-IL-6、IFN-γ 与 NF-κB 之间的协同调节关系还需进一步证实。

参考文献：

[1] Bals R, Wang X, Meegalla R L, *et al*. Mouse β-defensin 3 is an inducible antimicrobial peptide expressed in the epithelia of multiple organs[J]. Infect Immun, 1999, 67(7): 3542－3547.

[2] Jia H P, Wowk S A, Schutte B C, *et al*. A novel murine β-defensin expressed in tongue, esophagus and trachea[J]. J Biol Chem, 2000, 275(43): 33314－33320.

[3] Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences[J]. Cell, 1986, 46(5): 705－716.

[4] Kopp E B, Ghosh S, Inoue M, *et al*. NF-κB and Rel proteins in innate immunity[J]. Adv Immunol, 1995, 58: 1－27.

[5] Akira S, Nishio Y, Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gP130-mediated signaling pathway[J]. Cell, 1994, 77(1): 63－71.

[6] Grigorov I, Lazic T, Cvetkovic I, *et al*. STAT3 involvement in the acute phase-related expression of the rat haptoglobin gene[J]. Mol Biol Rep, 2000, 27: 81－86.

[7] Wu H, Zhang G, Minton J E, *et al*. Regulation of cathelicidin gene expression: induction by lipopolysaccharide, interleukin-6, retinoic acid, and Salmonella enterica serovar Typhimurium infection[J]. Infect Immun, 2000, 68(10): 5552－5558.

[8] Matsusaka T, Fujikawa K. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(21): 10193－10197.

[9] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京：协和医科大学出版社，1993. 352.

(编辑 张 宁)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net