

生血合剂干预下免疫介导再障小鼠 骨髓核因子 κ B 表达变化

罗梅宏^{1*}, 周永明², 胡明辉², 陆嘉惠², 孙曼萍², 薛志忠², 鲍计章²

(1. 上海市浦东新区浦南医院, 上海 200125; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437)

[摘要] 目的: 进一步探讨获得性再生障碍性贫血(AA)发病机制及健脾补肾活血方生血合剂治疗AA的疗效机制。方法: 以环孢素为对照, 免疫介导AA小鼠为研究对象, 采用定量PCR(Q-PCR)、免疫组织化学等方法分析生血合剂干预前后AA小鼠骨髓核因子 κ B(NF- κ B) mRNA水平、蛋白表达及活性变化。结果: AA小鼠骨髓单个核细胞NF- κ B mRNA水平未见明显改变, 与正常对照比无显著差异($P > 0.05$); 骨髓细胞NF- κ B/p65蛋白表达较正常组增加, p-I κ B α 表达明显下降, 生血合剂干预后NF- κ B/p65蛋白表达减少, 而p-I κ B α 表达明显提高; 与之相比, 环孢素作用后NF- κ B/p65蛋白及p-I κ B α 均急剧下降。结论: NF- κ B蛋白表达异常及活性改变可能参与了免疫介导AA小鼠模型的形成; 生血合剂可能通过调节NF- κ B的表达及活性发挥改善免疫介导AA小鼠造血功能的作用。

[关键词] 再生障碍性贫血; 生血合剂; 疗效机制; 核因子- κ B; 免疫介导

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)10-0050-04

Changes for NF- κ B in Bone Marrow of Mice Model for Immune-mediated Aplastic Anemia Controlled by Shengxue Mixture

LUO Mei-hong^{1*}, ZHOU Yong-ming², HU Ming-hui², LU Jia-hui², SUN Man-ping², XUE Zhi-zhong², BAO Ji-zhang²

(1. Punan Hospital Pudong District, Shanghai 200125, China;

2. Yueyang Hospital Affiliate Shanghai University of TCM, Shanghai 200437, China)

[Abstract] **Objective:** To explore further the pathogenesis of acquired aplastic anemia (AA) and the curative effect mechanism of Shengxue Mixture (SXM), which is a Chinese materia medica compound with the function of reinforcing the spleen and nourishing the kidney and promoting blood circulation. **Methods:** Cyclosporin A as a control, mRNA and protein level and activity of NF- κ B in bone marrow of mice model for immune-mediated aplastic anemia (AA) were detected with Q-PCR and immunohistochemistry technique before and after given SXM. **Result:** No significant changes for NF- κ B mRNA expression were observed in bone marrow single nuclear cells (SNCs) of mice with AA, but NF- κ B/p65 protein were highly expressed. Otherwise, p-I κ B α protein lowerly. However, SXM could decrease NF- κ B/p65 protein and increase p-I κ B α . By comparison, not only NF- κ B/p65 but also p-I κ B α was decreased significantly by Cyclosporin A. **Conclusion:** Abnormal protein expression and activity changes of NF- κ B may play a role in mice model for infusion-induced AA. And SXM may improve hematopoiesis function of the mice by modulating expression and activity of NF- κ B.

[Key words] acquire aplastic anemia; Shengxue Mixture; curative effect mechanism; NF- κ B; immune-mediate

[收稿日期] 2008-03-27

[基金项目] 第37批中国博士后科学基金项目资助(2005037146)

[通讯作者] * 罗梅宏, Tel: (021) 51353399-8202; E-mail: lmh021009@163.com

核因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB) 是一种重要转录因子, 在人 CD34⁺ 细胞信号传导、基因表达和转录以及存活和/或分化方面具有非常重要的意义。生血合剂是周永明教授研制的治疗再障的有效中药复方制剂, 疗效肯定^[1]。本文以 NF- κB 为内容, 以免疫介导再障小鼠模型为研究对象, 从 NF- κB mRNA 水平、蛋白表达及活性等方面探讨生血合剂的疗效机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料 DBA/2 小鼠(H-2^a, MLS^a), 4 只, 雌雄不限, (6~14) 周龄, 作为细胞供体; BALB/C 小鼠(H-2^d, MLS^b), 103 只, 雌性, 8~12 周龄, 上述动物均购自中科院上海实验动物中心。生血合剂(黄芪 15 g, 党参 15 g, 熟地 15 g, 女贞子 15 g, 补骨脂 15 g, 菟丝子 15 g, 丹参 15 g, 三七 10 g), 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院中药制剂室制成含生药 2 g·mL⁻¹ 的水煎剂; 新赛西平(CsA), 国药准字 H10960123, 批号 040354, 杭州中美华东制药有限公司生产, 用无菌生理盐水配成 4 mg·mL⁻¹。

1.2 主要仪器和试剂 荧光定量 PCR 仪(美国, ABI7000IMS); IMS 细胞图像分析系统(上海申腾信息技术有限公司); NF- κB 引物、探针和 FQ-PCR 试剂盒(达辉生物); TRIZOLTM(联合生物集团公司); 小鼠单克隆抗体 p-I $\kappa\text{B}\alpha$ (B-9) 和 NF- κB /p65 (Santa Cruz 公司); 即用型非生物素免疫组化 EliVisionTM plus 检测试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)。

1.3 模型建立与分组 将 103 只 BALB/C 小鼠随机分成 4 组, 正常对照组 22 只, 模型组、生血合剂组、环孢素组各 27 只。参照文献方法^[2](略有改良), 取 DBA/2 小鼠断颈处死, 用 75% 酒精浸泡 5 min, 常规消毒后取出胸腺, 加少量生理盐水洗去血迹, 轻轻磨碎后用尼龙网过滤, 通过 4 号针头使成单细胞悬液, 台盼蓝鉴定细胞活性(活性细胞达 95% 以上), 细胞计数后配成所需浓度备用。BALB/C 小鼠经 ⁶⁰Co5.5Gy 射线全身照射后, 4h 内由尾静脉输入取自 DBA/2 小鼠胸腺淋巴细胞悬液, 输细胞量为每只 $1 \times 10^6 \cdot 0.2 \text{ mL}^{-1}$ 。处理组在造模当天起开始给药, 生血合剂组按 40 g·kg⁻¹·d⁻¹ 给予生血合剂, 约 0.4 mL, Bid, ig; 环孢素组按 0.08 g·kg⁻¹·d⁻¹, Bid, ig; 模型组、正常对照组均给予等量生理盐水, Bid, ig。

1.4 定量 PCR 检测 处于濒死状态时或观察满 20 d 小鼠, 分批活杀, 切取股骨, 用生理盐水冲出骨髓,

淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 用 1.5 mL 无酶管冻存于 -70 °C 备用。采用 Trizol 法抽提总 RNA, 将 RNA 标本等浓度稀释后进行反转录, NF- κB 引物为上游 5'-CCTTCITGGTTCTGAAATGAAATGTA-3', 下游 5'-CGAGCGCCATGATTGCTA-3'。制备好的阳性标准和检测样本同时上机进行定量 PCR 分析, 探针为 5'-FAM-TTGCCACGCACAGACGGTGT-TAMRA-3', 反应条件为: 93 °C 2 min, 然后 93 °C 45 min, 55 °C 1 min, 10 循环; 93 °C 45 min, 55 °C 1 min, 30 循环。结果以 CT 值表示。

1.5 免疫组化染色 石蜡切片脱蜡和水化后, 用 PBS(pH 7.4) 冲洗 3 次, 每次 3 min(3×3'); 10% 的马血清封闭 20 min(湿盒内), PBS 冲洗 3×3'; 置于 10 mM pH 6.0 柠檬酸缓冲液中煮沸 10~20 min, 室温下冷却 20 min; 每张切片加 1 滴或 50 μL 的 3% H₂O₂, 室温下孵育 10 min, 以阻断内源性过氧化物酶的活性, PBS 冲洗 3×3'; 除去 PBS 液, 每张切片加 1 滴或 50 μL 的第一抗体(1:200 稀释), 4 °C 过夜; PBS 冲洗 3×3', 除去 PBS 液, 每张切片加 1 滴或 50 μL 聚合物增强剂(试剂 A), 室温下孵育 20 分钟, PBS 冲洗 3×3'; 除去 PBS 液, 每张切片加 1 滴或 50 μL 酶标抗鼠/兔聚合物(试剂 B), 室温下孵育 30 min, PBS 冲洗 3×3'; 除去 PBS 液, 每张切片加 1 滴或 50 μL 新鲜配制的 DAB 溶液, 显微镜下观察 3~5 min; 自来水冲洗, 苏木素复染; 切片经梯度酒精脱水干燥, 二甲苯透明, 中性树胶封固。染色后的切片在 IMS 细胞图像分析系统中用免疫组化定量软件进行定量分析。每张切片随机观察 3 个视野(×200), 用细胞图像分析软件测量, 平均计值后换算为阳性面积(area), 并求得阳性面积百分比(一个视野的像素为 510×510)。

1.6 统计方法 数据采用 Sigmasat 软件进行分析, 数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析方法进行统计分析, 组间两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 各组小鼠骨髓单个核细胞 NF- κB mRNA 变化 模型组小鼠骨髓单个核细胞 NF- κB mRNA 与正常组比无显著性差异($P > 0.05$), 生血合剂组与环孢素组、正常组及模型组比均无显著性差异($P > 0.05$)。(见表 1)。

表 1 各组小鼠骨髓单个核细胞 NF- κ BmRNA 表达变化(CT 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	n	NF- κ B
正常组	—	15	20.867 $\pm$ 0.518
模型组	—	21	20.286 $\pm$ 0.688
生血合剂组	40	19	19.149 $\pm$ 0.386
环孢素组	0.08	20	19.844 $\pm$ 0.404

2.2 各组小鼠骨髓 NF- κ B/p65, p-I κ B α 表达 如表 2 所示,模型组骨髓 NF- κ B/p65 表达面积较正常组增加,经生血合剂组干预后表达面积明显减少,但仍高于正常对照,环孢素作用后表达面积明显下降。模型组骨髓 p-I κ B α 表达面积明显低于正常组,生血合剂干预后表达面积增加,但仍低于正常对照,环孢素作用后表达面积明显下降。

表 2 各组小鼠骨髓细胞 NF- κ B/p65、p-I κ B α 蛋白表达($\bar{x} \pm s$, n = 15)

组别	剂量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	NF- κ B/p65(%)	p-I κ B α (%)
正常组	—	11.088 $\pm$ 0.214 ³⁾	17.811 $\pm$ 1.617 ³⁾
模型组	—	18.137 $\pm$ 0.050	4.605 $\pm$ 0.347
生血合剂组	40	15.295 $\pm$ 0.128 ³⁾	10.316 $\pm$ 0.259 ³⁾
环孢素组	0.08	8.370 $\pm$ 0.208 ³⁾	3.071 $\pm$ 0.193 ³⁾

注:与模型组比 ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ $P < 0.001$

3 讨论

NF- κ B 作为重要的转录因子,在造血细胞生存、发育、分化中发挥着重要的作用。虽然 NF- κ B 在 AA 发病中的作用尚未见研究报道,但是其多方面的生物功能提示, NF- κ B 可能与 AA 的发生存在一定的关系。首先, NF- κ B 是造血相关的某些基因产物表达所必须的,包括 IL-1 β , TNF- α , IL-6, INF- γ 等。同时, NF- κ B 又可以被调控造血的细胞因子(TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , INF- γ , TGF-1 等)激活,而大量的研究已经证实 AA 存在上述细胞因子表达异常;其次, NF- κ B 在人 CD34⁺ 细胞信号传导、基因表达和转录中发挥非常重要的作用, Soichi Nakata 等^[3] 的研究显示 NF- κ B 家族蛋白通过消除活性氧化物(reactive oxygen species, ROS)防止凋亡的功能在造血的多个阶段起着至关重要的作用。另外有报道^[4~5] NF- κ B/ROS 系统参与 Fas 介导的凋亡。而 Fas 介导的造血干/祖细胞凋亡是 AA 造血功能异常的重要机制之一^[6~7]。因此 NF- κ B 可能通过 Fas 途径参与 AA 发病干细胞凋亡。再有, NF- κ B 胞浆、核内表达呈动力学改变, TNF- α 是影响这一动力学改变的重要细胞因子。AA 中高表达的 TNF- α 就有可能影响 NF- κ B 活性,进而影响

造血细胞的生存、增殖及分化。骨髓微环境中的重要粘附分子血管细胞粘附分子-1(vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)的表达主要由转录因子 NF- κ B 控制^[8],而 VCAM-1 在分化发育中起着协助造血细胞粘附定位于利于发育的微环境、参与造血细胞与基质细胞形成聚集体、参与造血细胞的归巢和迁移的重要作用。并且有研究证实 AA 存在 VCAM-1 表达异常^[9~10]。总之, NF- κ B 有可能通过多种途径参与 AA 的发病。

基于以上背景,本文对 NF- κ B 在免疫介导 AA 小鼠模型形成中的作用及生血合剂对其的影响进行了研究,结果发现免疫介导 AA 小鼠骨髓单个核细胞的 NF- κ BmRNA 水平未见明显改变,但骨髓 NF- κ B/p65 蛋白表达增加。为分析其活性情况,根据文献[11~12]我们检测了能反应其活性的 p-I κ B α 表达水平,结果显示 NF- κ B 活性明显下降。经生血合剂干预后 NF- κ B/p65 蛋白表达减少,而 NF- κ B 活性却明显提高。与之相比,环孢素作用后,无论 NF- κ B 蛋白表达还是活性均急剧下降,可能与严重的骨髓腔内出血和急骤的骨髓细胞减少有关。此结果提示, NF- κ B/p65 蛋白及其活性改变可能参与了免疫介导 AA 小鼠模型的形成,而生血合剂对其表达及活性有改善作用,可能通过对 NF- κ B 的调节发挥其调节细胞免疫、减少造血细胞凋亡、改善造血微环境等功能,但具体作用环节还有待于进一步研究。另外,虽然免疫介导的 AA 和人类 AA 有许多共同的病理生理特征,但并不能完全复制人类 AA。所以课题组正在开展临床研究,希望能从 NF- κ B 角度进一步阐释 AA 的发病机制,并为中医药治疗 AA 的研究提供可能的新思路。

[参考文献]

- [1] 周永明,黄振翘,黄 韬,等.生血合剂治疗再生障碍性贫血的临床研究[J].中国中西医结合杂志,2000,20(3):173-175.
- [2] 姚 军,李树浓.淋巴细胞与再生障碍性贫血的实验研究[J].中华血液学杂志,1991,12(5):229-231.
- [3] Soichi Nakata, Itaru Matsumura, Hirokazu Tanaka. NF- κ B family proteins participate in multiple steps of hematopoiesis through elimination of reactive oxygen species[J]. J Bio Chem. 2004, 279(53):5578-55586.
- [4] Woo SH, Park IC, Park MJ, et al. Arsenic trioxide sensitizes CD95/Fas-induced apoptosis through ROS-

- mediated upregulation of CD95/Fas by NF-kappaB activation [J]. *Int J Cancer*. 2004, 112(4): 596-606.
- [5] Carlise ML, King MR, Karp DR. Gamma-glutamyl transpeptidase activity alters the T cell response to oxidative stress and Fas-induced apoptosis[J]. *Int Immunol*. 2003, 15 (1): 17-27.
- [6] Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, *et al.* Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34⁺ cells of patients with aplastic anaemia[J]. *Br J Haematol* 1995, 91: 245-252.
- [7] Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, *et al.* Fas antigen expression on CD34⁺ human marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro[J]. *Blood* 1995, 85: 3183-3190.
- [8] Ahmad M, Marui N, Alexander RW, *et al.* Cell type-specific transactivation of the VCAM-1 promoter through an NF-kappa B enhancer motif[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270 (15): 8976-8983.
- [9] 董凌莉, 刘文励, 孙汉英, 等. 川芎嗪对再生障碍性贫血小鼠骨髓细胞粘附分子作用研究[J]. *中华医学杂志*, 1999, 20(4): 178-179.
- [10] 俞亚琴, 孙伟正, 孙 凤, 等. 补髓生血冲剂对慢性再生障碍性贫血患者骨髓基质细胞粘附分子 ICAM-1、VCAM-1 的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2004, 11 (6): 476-478.
- [11] Sun Q, Matta H, Chaudhary PM. The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein protects against growth factor withdrawal-induced apoptosis via NF-kappa B activation[J]. *Blood*, 2003, 101: 1956-1961.
- [12] Liu L, Eby MT, Rathore N, *et al.* The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the Ikappa B kinase complex[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 13745-13751.