

增龄进程淋巴细胞核转录因子 κ B 相关基因表达及淫羊藿总黄酮的调控作用

刘小雨¹ 王 琦² 夏世金² 吴 斌² 黄建华² 沈自尹²

(1. 同济大学附属第十人民医院中医科, 上海市延长中路 301 号, 200072; 2. 复旦大学附属华山医院中西医结合研究所)

[摘要] **目的** 研究增龄进程中大鼠淋巴细胞中核转录因子 κ B(NF- κ B) 信号通路跨膜受体的 mRNA 水平差异表达特征, 以及淫羊藿总黄酮(EF) 对其的干预效应。**方法** 将SD 大鼠随机分为3 天、4 月龄、10 月龄、18 月龄、27 月龄、27 月+EF, 以大鼠脾脏分离的淋巴细胞为研究对象, 定制NF- κ B 信号通路基因芯片, 分别检测各组NF- κ B 信号通路上游跨膜受体 mRNA 水平的整体表达特征及差异, 并观察EF 对NF- κ B 相关基因的干预效应。**结果** Tgfb β 2、Tlr7、Ripk2 出生3 天表达最低, 4 或10 个月达峰值, 之后渐低, 至27 个月降至最低, EF 干预后Ripk2 变化较明显, 接近10 个月水平; Tnfrsf1a 与Tlr2 在3 天时达峰, 4 个月骤然降低, 而后在10、18、27 个月均维持在一相近的水平, 但经EF 作用后有显著升高; Tnfrsf5 自3 天至18 个月逐渐升高, 但至27 个月骤然下降, EF 作用后略有回升; Madh4 表达比较特殊, 在4 个月最高, 10 个月最低, 18 个月显著升高, 至27 个月再次降低, EF 干预后略有提高, 但变化不明显; Tnfrsf10b、Il1r1、Tlr1、Tlr4 在增龄进程中的变化不明显。**结论** 淫羊藿总黄酮的提前干预可对增龄进程淋巴细胞NF- κ B 信号通路跨膜受体基因 mRNA 表达产生一定的良性影响, 尤其是对Ripk2 的作用最为显著, 这可能是EF 作用的重要靶点之一。

[关键词] 核转录因子 κ B; 跨膜受体; 基因芯片; 淋巴细胞; 淫羊藿总黄酮; 增龄

Expression of Lymphocyte NF- κ B Related Gene in Age Increasing and the Regulative Function of Total Flavone of Epimedium

LIU Xiaoyu¹, WANG Qi², XIA Shijin², et al.

(1. The Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072; 2. Huashan Hospital of Fudan University)

ABSTRACT **Objective** To study the lymphocyte NF- κ B signal passage cross membrane acceptor mRNA expression characteristics of rats in increasing age and the intervention effect of total flavone of Epimedium (EF). **Methods** The SD rats were randomized into 6 groups: 3 days (3d), 4 months (4m), 10 months (10m), 18 months (18m), 27 months (27m), 27m+EF. The lymphocytes separated from the spleen of rats were taken as the object and the NF- κ B signal passage gene chip was used to examine the expression characteristics and differences of NF- κ B signal passage upstream cross membrane acceptor mRNA of each group and to observe intervention effect of EF on NF- κ B related gene. **Results** The expression of Tgfb β 2, Tlr7, Ripk2 of 3d was the lowest, reached the peak 4m or 10m, afterward gradually lowered, dropping to the lowest 27m, with EF intervention, Ripk2 changed obviously, close to 10m level; Tnfrsf1a and Tlr2 reached the peak on the 3d, in the 4m reduced suddenly, then in 10m, 18m and 27m maintained at a similar level, but with the EF intervention they were obviously increased; Tnfrsf5 increased gradually from 3d to 18m, but dropped suddenly in 27m, with EF intervention, it was slightly increased; the Madh4 expression was quite special, to the highest in 4m, to the lowest in 10m, increased obviously in 18m, reduced again in 27m, with EF intervention, slightly increased; the change of Tnfrsf10b, Il1r1, Tlr1, Tlr4 in increasing age was not obvious. **Conclusion** In the senile advancement, lymphocyte NF- κ B signal passage cross membrane acceptor mRNA increasing age dependence expression regulation characteristics were not inconsistent, the EF intervention produces a certain good influence on the old age group for gene mRNA expression, particularly a remarkable effect on Ripk2. This is possibly one of important targets of EF functions.

Key Words NF- κ B; Cross membrane acceptor; Gene chip; Lymphocyte; Total flavone of Epimedium; Increasing age

核转录因子 κ B(NF- κ B) 与增龄进程有密切关系, 构成NF- κ B 信号通路的相关分子均有可能在此进程中扮演非常重要的角色^[1~5], 因此本研究对不同月龄大鼠脾脏淋巴细胞NF- κ B 信号通路的跨膜受体类分子差异基因的mRNA 表达特征进行了系统分析, 并观察了补肾中药淫羊藿总黄酮(epimedium koreanum nakai total

flavonoids, EF) 对NF- κ B 相关基因的干预效应。

1 材料与方法

1.1 主要药物与试剂

采用辽宁产朝鲜淫羊藿, 由第二军医大学药学院天然药物研究室提取EF, 纯度为65%左右, 临用前用蒸馏水配制成3g/100ml 的溶液备用。大鼠Oligo GEArray^(R) NF- κ B 信号途径分类Oligo 基因芯片(128 个相关基因 SuperArray^(R) service), 淋巴细胞分离液 (Cedarlane); TrueLabeling-AMP^(TM) 线性RNA 扩增

试剂盒 (SuperArray), Biotin-¹⁶-dUTP (Roche); ArrayGrade cRNA 纯化试剂盒 (SuperArray); GEArray 杂交液 (SuperArray); 化学发光检测试剂盒 (SuperArray); CDP-Star 化学发光底物。

1.2 主要仪器

洁净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); DK-8D 型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司); FeroTec Gradien PCR 基因扩增仪(杭州大和热磁电子有限公司); DYY-8 型稳压稳流电泳仪(上海琪特分析仪器有限公司); 扫描仪(上海天能仪器有限公司); 脱色摇床(江苏兴化化学仪器厂); 反应容器(上海康成生物有限公司); 低温离心机(上海安亭科学医学仪器厂)。

1.3 动物分组及处理

清洁级健康雄性 SD 大鼠 60 只, 由复旦大学动物科学部提供, 动物合格证编号: 中科动管会 003 号, 实验动物机构许可证号: SCXK(沪) 2007-0002。随机分为 3 天、4 月、10 月、18 月、27 月、27 月+EF 组, 共 6 组, 每组各 10 只。第 24 个月开始, 27 月+EF 组予 EF (每天按 0.06g/kg, 溶于 5ml 蒸馏水中) 灌胃, 27 月组给予等量蒸馏水灌胃, 连续 3 个月。其余各组常规喂养。

1.4 脾脏淋巴细胞分离

无菌摘取脾脏, 采用 Lympholyte-Rat 试剂在超净台中分离脾脏淋巴细胞。具体方法见参考文献[3]。

1.5 GEArray 基因芯片实验操作

采用 Trizol^(R) (Invitrogen) 一步法, 提取脾脏淋巴细胞 RNA。按照 Oligo GEArray^(R) 芯片试剂盒使用说明进行芯片预杂交及杂交, 然后化学发光检测方法进行封闭和检测。

1.6 图像采集与数据分析

1.6.1 图像采集 芯片的空白面对准胶片, 确定芯片的方向为膜背面的条码在右边, 膜背面的芯片名称在顶端。使用 CDP-Star 孵育过后, 芯片即可用于图像采集。化学发光的芯片图像通过 X 胶片和扫描仪获得。

1.6.2 芯片数据处理与数据标准化 数据分析使用网上提供的综合型 GEArray 表达分析配套软件 (GEArray Expression Analysis Suite) 进行完整的芯片数据分析。具体方法参考软件使用说明。芯片数据处理后, 各组 mRNA 表达数据均取对数值, 对每张芯片上每个基因 G 的表达值 G_{val} 通过公式 $G_{val} = (G_{val} - \min) / (\max - \min)$ 进行标化, 其中 min、max 分别为该张芯片上所有基因表达值的最小值和最大值。然后进行以 2 为底的对数转换, 并对每个基因通过该基因在所有芯片中的中值进行一下居中(center)调整。

1.6.3 差异筛选 125 基因利用 SAM 算法进行差异筛选(FDR=0.01), 得到 104 个差异基因, 选取其中涉及到跨膜受体功能类的差异基因 13 个, mRNA 表达数据用($x \pm s$)表示。

2 结果

在 NF- κ B 信号通路跨膜受体功能分类中筛选出的差异基因有: Ripk2、Il1r1、Madh4、Tlr2、Tnfrsf1a、Tnfrsf5、Tlr6、Tgfb2、Tlr1、Tnfrsf10b、Tlr9、Tlr7、Tlr4、Tgfb1。根据跨膜受体类分子中筛选出差异基因的增龄依赖性特征规律, 大致分为以下 5 类, 见图 1、图 2。①Tgfb2、Tlr7、Ripk2: 出生 3 天表达最低, 4 个月或 10 个月达峰值, 之后渐低, 至 27 个月降至最低, EF 干预后 Ripk2 呈现较显著变化, 接近 10 个月水平。②Tnfrsf1a 与 Tlr2 在 3 天时达峰, 4 个月骤然降低, 而后在 10 个月、18 个月、27 个月均维持在一相近的水平, 但经 EF 作用后有显著升高。③Tnfrsf5 自 3 天至 18 个月逐渐升高, 但至 27 个月骤然下降, EF 作用后略有回升。④Madh4 表达比较特殊, 在 4 个月最高, 10 个月最低, 18 个月显著升高, 至 27 个月再次降低, EF 干预后略有提高。⑤Tnfrsf10b、Il1r1、Tlr1、Tlr4 在增龄进程中的变化非常平缓, 因而 EF 干预效应不显。

3 讨论

目前发现多种因素可以诱导 NF- κ B 活化, NF- κ B 上游激动剂包括: 各种细胞外配体, 跨膜受体, 衔接蛋白等。不同的受体接受的化学信号不同, 引起的生化反应也不同。其中细胞膜受体为位于细胞膜的相应的受体或敏感的特殊跨膜蛋白质, 大多糖蛋白、脂蛋白、糖脂蛋白等, 这种跨膜受体是跨膜信号转导的关键环节。在外界信号刺激下, 跨膜受体有选择的和细胞外信号物质结合, 导致细胞膜构象的变化、细胞膜离子转运改变或膜内酶的活性发生改变, 从而使细胞生物电活动及细胞功能变化并产生效应, 促使细胞功能和物质代谢朝一定方向规律性变化。跨膜受体膜内结构域具有蛋白质激酶活性, 当配体与受体胞外结构域结合时, 激酶活性就被激活, 磷酸化自身胞质结构域, 这种自动磷酸化使受体结合并活化蛋白质, 活化的靶蛋白质又与细胞内其他底物发生反应。信号转导的基本原理即在于受体的活性激发细胞内酶活性, 顺序有度的放大胞外原始信号, 进而活化一系列蛋白质。

对 NF- κ B 信号通路所有功能类别差异基因的 mRNA 表达特征系统分析, 发现各功能类分子的总体趋势几乎都呈典型的增龄依赖性变化, 以信号转导激酶最为明显, 这为衰老与 NF- κ B 信号通路的密切关系提供了重要证据。本研究发现, 在 NF- κ B 信号通路跨膜受体类分子中, Tgfb2、Tlr7、Ripk2、Tlr1、Tnfrsf1a

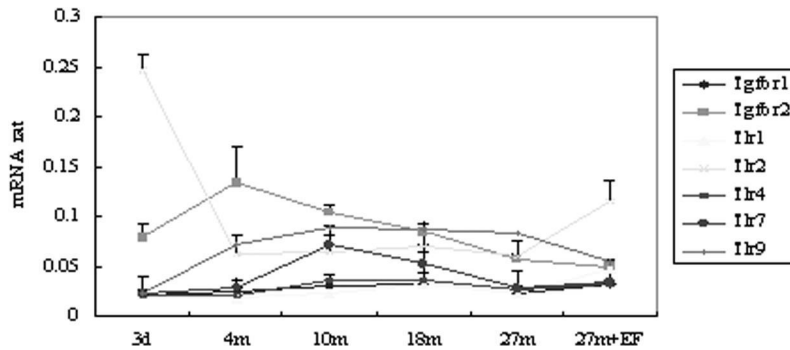


图1 EF对增龄进程淋巴细胞NF-κB信号通路跨膜受体mRNA表达的干预效应-1($x \pm s$)

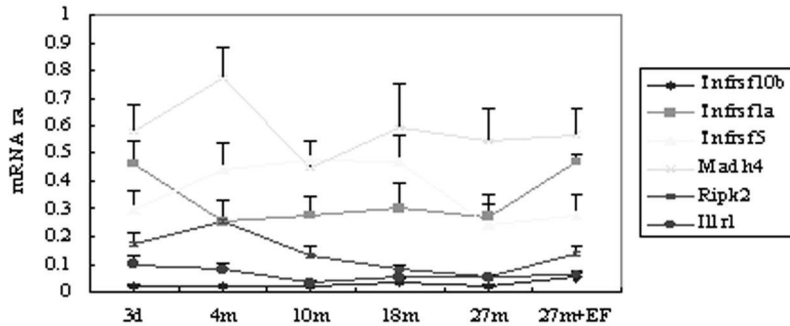


图2 EF对增龄进程淋巴细胞NF-κB信号通路跨膜受体mRNA表达的干预效应-2($x \pm s$)

均随增龄而呈现衰减变化,尤其是前3者更为典型,可能会成为该通路跨膜受体类基因在衰老进程中的重要分子标志,但本类其他分子表达则为比较平缓的过渡性变化,而且相对于NF-κB信号通路上游其他具有显著增龄依赖性特征的胞外受体、衔接蛋白等,跨膜受体类分子的增龄依赖表达规律不尽一致。

淫羊藿为补肾中药,其主要成分为黄酮,黄酮中的主要单体为淫羊藿苷和淫羊藿次苷,关于淫羊藿苷的研究比较多,其药理作用在免疫系统^[6]、生殖系统^[7]、神经内分泌系统^[8,9]等均有明确作用。但也有研究表明,淫羊藿粗提物的作用更为突出,因为仅淫羊藿总黄酮中就有数十种黄酮类成分,其中也许尚有很多未知但更有效的单体成分,并且各种单体之间的协同作用也值得重视^[10]。本研究结果表明,对老年期大鼠提前用EF干预3个月后,可使淋巴细胞NF-κB信号通路跨膜受体类相关分子中Ripk2表达提高到10月水平,初步提示Ripk2可能是EF在跨膜受体类分子中发挥延缓衰老作用的重要靶点。当然,因为限于本实验仅为mRNA水平表达,其蛋白表达尚待进一步研究。

参考文献

- [1] 刘小雨, 夏世金, 沈自尹. 衰老进程中核转录因子-κB表达的变化[J]. 中华老年医学杂志, 2007, 26(9): 713-716.
- [2] Giardina C, Hubbard AK. Growing old with nuclear factor-κB. Cell stress [J]. Chaperones, 2002, 7(2): 207-212.
- [3] 刘小雨, 沈自尹, 黄建华, 等. 淫羊藿总黄酮经由核因子-κB相关信号转导途径调控免疫衰老机制[J]. 中国中西医结合

杂志, 2006, 26(7): 620-624.

- [4] Trebilcock GU, Ponnappan U. Evidence for lowered induction of nuclear factor kappa B in activated human T lymphocytes during aging [J]. Gerontology, 1996, 42(3): 137-146.
- [5] Ponnappan S, Uken-Trebilcock G, Lindquist M, et al. Tyrosine phosphorylation-dependent activation of NFκappaB is compromised in T cells from the elderly [J]. Exp Gerontol, 2004, 39(4): 559-566.
- [6] Sun JL, Hu YL, Wang DY, et al. Immunologic enhancement of compound Chinese herbal medicinal ingredients and their efficacy comparison with compound Chinese herbal medicines [J]. Vaccine, 2006, 24(13): 2343-2348.
- [7] De Naeyer A, Pocock V, Milligan S, et al. Estrogenic activity of a polyphenolic extract of the leaves of Epimedium brevicornum [J]. Fitoterapia, 2005, 76(1): 35-40.
- [8] Pan Y, Zhang WY, Xia X, et al. Effects of icariin on hypothalamic-pituitary-adrenal axis action and cytokine levels in stressed Sprague-Dawley rats [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(12): 2399-2403.
- [9] Pan Y, Kong L, Xia X, et al. Antidepressant-like effect of icariin and its possible mechanism in mice [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2005, 82(4): 686-694.
- [10] Chiu JH, Chen KK, Chien TM, et al. Epimedium brevicornum Maxim extract relaxes rabbit corpus cavernosum through multitargets on nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway [J]. Int J Impot Res, 2006, 18(4): 335-342.

(收稿日期: 2007-12-12; 修回日期: 2008-09-16)

[编辑: 行之]