



制动致福利损伤大鼠肝细胞中 NF- κ B 的表达

梁磊, 马畅, 刘捷, 董敏, 方天, 胡文娟, 陈莉, 贾春梅, 恽时锋

(南京军区南京总医院比较医学科, 全军实验动物科普与伦理教育基地, 全国科普教育基地, 南京 210002)

【摘要】 目的 研究制动导致的福利损伤大鼠肝细胞内 NF- κ B 的表达变化。方法 选取 ± 170 g SD 大鼠, 雌雄各半, 使用制动的方式造成其福利损伤, 记录实验过程中的体增重和饲料消耗, 而后分别使用实时定量 PCR 和免疫印迹法检测大鼠肝细胞内 NF- κ B p65 的 mRNA 量和蛋白表达水平。结果 与对照组相比, 制动组大鼠的体增重和饲料能耗比均降低, 且差异极显著 ($P < 0.01$); 肝细胞中 NF- κ B p65 的 mRNA 量和蛋白表达水平均大幅提升, 同样差异极显著 ($P < 0.01$)。其中制动组雄性大鼠的 NF- κ B p65 的 mRNA 量和蛋白表达水平显著高于雌性 ($P < 0.05$), 但对对照组大鼠的雄性与雌性之间未表现出差异 ($P > 0.05$)。结论 大鼠福利受损时, 肝细胞中 NF- κ B 表达水平大幅提升, 提示两者之间可能存在一定关联, 表明 NF- κ B 参与了大鼠福利损伤过程。

【关键词】 福利损伤; NF- κ B; 基因表达

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0028-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.007

The study of expression of NF- κ B in rats' liver after welfare impaired by restrain stress

LIANG Lei, MA Chang, LIU Jie, DONG Min, FANG Tian, HU Wen-juan, CHEN Li, JIA Chun-mei, YUN Shi-feng
(Department of Comparative Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Army Education Base of Science and Ethics of Experimental Animal, National Science Education Base, Nanjing, 210002, China)

【Abstract】 **Objective** To study the expression of NF- κ B in rats' liver after welfare impaired by restraint stress. **Methods** SD rats, ± 170 g, male and female half, welfare were impaired by restraint stress. Body weight gain and food consumption were recorded throughout the study, mRNA and protein expression of NF- κ B p65 in liver were detected after the study finished by real-time quantitative PCR and Western blotting. **Results** Compared with the control group (group C), the body weight gain and food efficiency ratio (FER) of restraint group (group R) were decreased ($P < 0.01$), but mRNA and protein expression of NF- κ B p65 were much higher ($P < 0.01$). Compared with female, mRNA and protein expression of NF- κ B p65 of male rats were much higher in group R ($P < 0.01$), but showed no significant difference in group C ($P > 0.05$). **Conclusion** After welfare impaired, the expression of NF- κ B in rats' liver are much higher than before. It shows that NF- κ B has effects during the process of welfare being impaired.

【Key words】 Welfare impaired; NF- κ B; Gene expression

实验动物福利是动物实验研究中的一个重要问题, 因为福利受损的动物达不到“康乐”状态^[1], 不是标准的实验动物。其生存质量下降, 机体各系

统状态紊乱, 会对动物实验研究的进行造成影响, 降低实验结果的可靠性^[2]。但对于实验动物福利水平的评估尚缺乏直接的、具代表性的指标。NF-

[作者简介] 梁磊 (1982 -), 男, 技师, 理学学士, 研究方向: 实验动物福利伦理, 人类疾病动物模型。

[通讯作者] 恽时锋 (1965 -), 男, 主任技师, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 实验动物与比较医学, E-mail: yunshifeng1@163.com。

κ B (nuclear factor- κ B, 核因子- κ B) 是一类广泛存在于哺乳动物的各种组织和细胞中的调控因子, 在介导机体应激反应尤其是炎症反应的过程中起关键作用, 多种因素—应激、毒素、感染、LPS、TNF- α 、放射性物质等—均可刺激其活化, 使其表达水平上调^[3-4]。而动物实验中的各类干预因素对实验动物来说都是应激刺激, 符合 NF- κ B 的活化条件。因此, 本研究使用动物实验中常用的 SD 大鼠, 通过束缚制动以降低其福利水平^[5], 观测其肝组织中 NF- κ B 表达水平的变化, 探寻实验动物福利与 NF- κ B 之间的联系。

1 材料和方法

1.1 实验动物与饲养环境

SD 大鼠 32 只, 雌雄各半, 体重 ± 170 g, 由南京军区南京总医院比较医学科提供【SCXK(军)2012-0014】, 实验场所为南京军区南京总医院比较医学科屏障环境【SYXK(军)2012-0047】。Co⁶⁰ 灭菌全价饲料与高温高压灭菌饮用水, 自由采食。

1.2 实验分组与福利损伤模型建立

SD 大鼠随机挑选并分组如下 ($n = 8$):

对照组雄 (control male, CM): 雄性 SD 大鼠, 正常饲养。

对照组雌 (control female, CF): 雌性 SD 大鼠, 正常饲养。

制动组雄 (restrain male, RM): 雄性 SD 大鼠, 每日 9:00 ~ 10:00、15:00 ~ 16:00 各使用圆筒容器束缚制动 1 h, 制动程度为大鼠不感觉压迫但无法自由活动, 干预时间为 4 周。

制动组雌 (restrain female, RF): 雌性 SD 大鼠, 干预过程同 RM 组。

1.3 试剂及仪器

反转录试剂盒 (TaKaRa, #RR047A), PCR 仪 (MJ research, PTC 200), 荧光定量 PCR 检测系统 (Roche LightCycler 96); 一抗 10745-1-AP p65 antibody (Proteintech), 二抗山羊抗兔-HRP (santa cruz), Protein Marker (Takara), Acr、Bis、Tris (Sigma), TEMED、Gel Doc2000 成像系统、垂直电泳系统 (BIO-RAD)。

1.4 指标测定

1.4.1 实验过程中记录各组大鼠体重变化及进食量, 实验结束计算体增重和饲料能效比:

体增重 = 实验结束体重 - 初始体重

饲料能效比 (food efficiency ratio, FER) = 体增重 / 总进食量 $\times 100\%$

1.4.2 实时荧光定量 PCR 检测 NF- κ B p65 mRNA 含量

取大鼠肝脏组织, 充分裂解后按 Trizol 操作说明提取总 RNA。反转录体系为 20 μ L, 每管加入总 RNA 4 μ g, 按照 TaKaRa #RR047A 反转录试剂盒说明操作, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 70 $^{\circ}$ C 15 min。反转录后的 cDNA 用于实时定量 PCR 反应, 引物由南京中兴医学技术有限公司合成, p65 上游引物 5'-TCACCAA GACCCACCTCACCG-3', 下游引物 5'-GGACCGCA TTCAAGTCATA GTCCC-3', 扩增片段长度 243 bp, 退火温度 60 $^{\circ}$ C; GAPDH 上游引物 5'-ATCATCTCCG CCCCTTCTGC-3', 下游引物 5'-GCCTGCTTACCA CCTTCTT-3', 扩增片段长度 437 bp, 退火温度 57 $^{\circ}$ C。反应体系: SYBR Premix Ex Taq II (2 \times) 10 μ L, cDNA 2 μ L, 上、下游引物各 1 μ L (10 μ mol/L), 加入 Nuclease-Free Water 至 20 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, (95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s) \times 40 个循环, 每个样品 3 次重复。将对照组雄性大鼠基因表达水平定为 1, 分析其他组别的基因表达差异。

1.4.3 Western blot 检测 NF- κ B p65 蛋白表达

取肝脏组织, 裂解细胞提取总蛋白。10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 蛋白转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭, 一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, 二抗 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 洗膜 ECL 显影。以 GAPDH 为内参照, 每组样本进行 3 次重复。

1.5 统计学方法

实验数据统计使用 SPSS13.0 完成, 结果均使用 $\bar{x} \pm S$ 表示, 组间差异比较使用单因素方差分析, 选取 $\alpha = 0.05$, $\alpha = 0.01$ 。

2 结果

2.1 体增重与饲料能效比较

如表 1 所示, 制动组大鼠无论雌雄其体增重数据均远低于同性别对照组大鼠, 且差异极其显著 ($P < 0.01$); 制动组大鼠的饲料能效 (food efficiency ratio, FER) 数据也与同性别的对照组大鼠有较大差距, 其中雄性制动组大鼠 FER 数据差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 基因表达

实时荧光定量 PCR 目的基因 NF- κ B p65 和内参 GAPDH 的标准曲线线性良好, 引物扩增效率为 99.8%。结果如图 1 所示, 无论雌雄, 制动组大鼠的该基因表达量远远高于对照组。数据分析表明, 与对照组大鼠相比, 制动组大鼠的该基因表达显著升高 ($P < 0.01$)。但制动组不同性别大鼠之间表达量

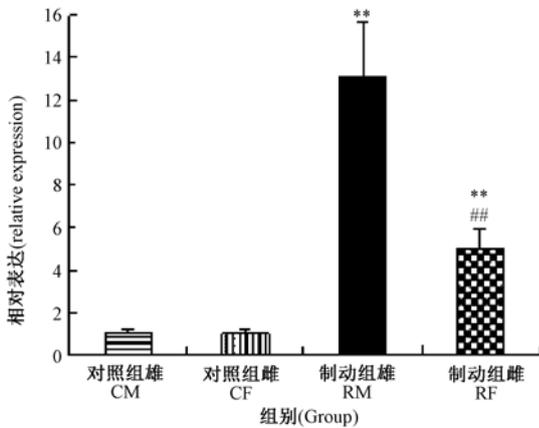
也存在显著差异 ($P < 0.01$), 对照组不同性别大鼠之间未显示出统计学差异。

表 1 各组大鼠体增重与饲料能效比

Tab.1 Body weight gain and food efficiency ratio of different groups

组别 Group	体增重 Body weight gain(g)	饲料能效比 Food efficiency ratio(%)
对照组雄(CM)	305.05 ± 18.58	25.19 ± 1.99
对照组雌(CF)	132.67 ± 6.98	13.34 ± 1.96
制动组雄(RM)	253.33 ± 23.31**	23.04 ± 2.43*
制动组雌(RF)	102.50 ± 13.19**	11.43 ± 2.15

注: * 表示与同性别对照组比较, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (n=8)。
Note: Compare with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (n=8).



注: ** 表明与同性别对照组比较, $P < 0.01$;
表明与同组别雌性相比, $P < 0.01$ (n=8)。

图 1 各组大鼠肝细胞 NF-κB p65 基因表达

Note: ** means compare with control group, $P < 0.01$;
means compare with male, $P < 0.01$ (n=8).

Fig.1 Gene expression of NF-κB p65 in liver of different groups

2.3 蛋白表达

Western Bolt 结果如图 2 所示, 制动组大鼠肝细胞中 NF-κB p65 蛋白表达水平高于对照组大鼠。表 2 将各组大鼠蛋白相对表达量进行了统计分析, 表明制动组大鼠蛋白相对表达量显著高于对照组大鼠 ($P < 0.01$)。同组别雄性大鼠的相对表达量均高于雌性大鼠, 其中制动组的差异显著 ($P < 0.05$), 但

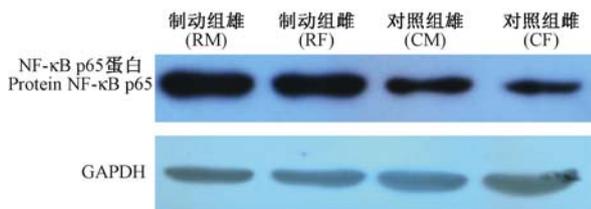


图 2 各组大鼠肝细胞 NF-κB p65 蛋白表达

Fig.2 Expression of NF-κB p65 in liver of different groups

对照组的差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠肝细胞 NF-κB p65 表达统计结果

Tab.2 The statistical results of NF-κB p65 expression in liver of different groups

组别 Group	NF-κB p65 蛋白相对表达 NF-κB p65/GAPDH
制动组雄(RM)	1.5888 ± 0.0172**
制动组雌(RF)	1.3684 ± 0.0219**#
对照组雄(CM)	0.8287 ± 0.0626
对照组雌(CF)	0.6974 ± 0.0743

注: ** 表明与同性别对照组比较, $P < 0.01$; # 表明与同组别雄性相比, $P < 0.05$ (n=8)。

Note: ** means compare with control group, $P < 0.01$; # means compare with male, $P < 0.05$ (n=8).

3 讨论

动物实验中的各种处理因素对实验动物造成的身心创伤及其累积效应是主要的福利损害^[6], 本实验中正是使用反复制动来模拟正常实验过程中的抓取与保定过程, 以试图对实验动物福利造成损害。制动术目前广泛应用于身心压力引发各类动物损害的实验研究中^[5], 是一种较为常用的轻度福利损害手段。结合本实验中的数据, 制动组大鼠的体增重和饲料能耗均显著低于对照组大鼠, 可以认为制动组大鼠已经福利受损。

NF-κB 是 1986 年 Sen 和 Baltimore^[7] 在 B 淋巴细胞中发现的一类能和免疫球蛋白 κ 轻链基因的增强子特异结合的核因子, 广泛存在于各种真核细胞中。它由两类 Rel 家族亚基组成, 活性 DNA 结合形式是两类亚基的同源或异源二聚体, 其中以 P50 和 P65 组成的二聚体最为常见^[8]。当受到如应激等细胞外信号的刺激时, 经过一系列连锁的酶促反应, IκB(核因子-κB 抑制蛋白)从 NF-κB 三聚体上解离下来, 从而使 NF-κB 二聚体活化、入核, 启动特异靶基因的转录和表达^[9-11]。它在调控炎症因子、细胞因子、粘附分子等的表达, 免疫应答及细胞增殖、分化、凋亡的过程中均起关键作用^[12-13]。其中经 NF-κB 介导调控的多种因子如 TNF-α、IL-1、IL-2、IL-6 均可促进机体的炎症反应, 产生机体损伤。通常情况下, 当福利水平下降时动物往往表现出毛色不顺、食欲下降、免疫抑制、代谢及内分泌紊乱等一系列问题, 本实验中, 对照组大鼠 NF-κB 仅轻微表达, 但制动组大鼠经制动处理后福利受损, NF-κB 表达水平显著上调, 其中制动组雄性大鼠的基因表达量甚至到达了相应对照组大鼠的近 14 倍之多, 表明了 NF-κB 极有可能在这一系列过程中产生了作用, 即 NF-κB 参与了福利损伤及其导致的机体内功能

紊乱过程。

对多种动物的观察和研究表明,动物的福利水平表现为动物在适应环境改变过程中付出的生物学代价,评价这一生物学代价必须综合考虑动物外观、行为模式、生长发育水平、特异性和非特异性免疫力、神经内分泌反应以及器官组织病理等多个指标的变化^[14]。因此,我们在评估动物福利水平变化时大都要综合分析行为学、生长发育、免疫及神经内分泌等多方面指标。但这些指标已经是福利水平降低所引发的一系列复杂的信号传导、调控的终末表现,当我们观察到这些指标时就表明福利损害已经发生,实验动物的福利水平已经受到了影响。NF- κ B 是一种广泛存在于组织和细胞中,能介导机体应激反应的关键调控因子,在机体的应激反应过程中发挥重要的作用,而本研究所探讨的福利损伤其本质是实验因素的身心压力累积而对实验动物形成的一个慢性应激过程,引发福利损伤的因素恰属于 NF- κ B 的激活因素。并且 NF- κ B 是一种上游调控因子,相对于能较早的提示福利损伤的发生。

根据本次实验的结果,我们认为 NF- κ B 有可能作为一个具代表性的福利衡量指标,用以评估实验动物福利损害,但通过本次实验我们也发现了若干问题。首先,制动组雄性大鼠的 NF- κ B 水平不但显著高于对照组,同时与同组的雌性大鼠也存在统计差异。经我们研究发现,其原因可能有 2 个方面:一是由于雌性大鼠生长速度低于雄性,相对于束缚容器而言体型较小,导致其束缚效果不如雄性大鼠,从而导致了表达水平的差异;二是由于性别差异,杜晓辉等^[15]的研究表明,性别差异对脓毒症大鼠肝脏 NF- κ B 活化具有影响,雌性大鼠的 NF- κ B、TNF- α 及 ALT 的变化均显著低于雄性。自然界中雌性个体对于应激等因素的耐受性往往要强于雄性个体,在本实验中的表现也是如此。由此可见性别和干预因素对于 NF- κ B 的表达具有很大的影响,这也引发了我们对于动物实验中性别选择的思考。同时本实验使用的制动术是经过大量实验研究论证的,其福利损伤效果目前已被广泛接受。若实验动物经其他因素处理,NF- κ B 与福利水平是否仍有关联?其次,NF- κ B 要成为一个具代表性的福利衡量指标,并且要及早提示福利损伤的发生,那么 NF- κ B 能否于行为学、免疫、内分泌等指标变化之前发生显著变化,同时 NF- κ B 与行为学、免疫、内分泌等指标之间是否具有相关性,我们仍不得而知。除此之外,根据嵇晴等^[16]的研究,特定剂量的氯胺酮可以抑制 NF- κ B 的活性,减少 TNF- α 的释放,有益于机体恢

复。那么我们设想既然 NF- κ B 参与了福利损伤过程,那么当我们使用抑制剂抑制 NF- κ B 的表达时,能否缓解福利损伤情况?因此,要明确 NF- κ B 能否成为一个具代表性的福利衡量指标,我们仍有很多工作要做,许多问题仍有待进一步研究论证。

参考文献:

- [1] 考林·斯伯丁. 动物福利[M]. 崔卫国,译,北京:中国政法大学出版社,2005: 12.
- [2] Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C. Laboratory routines cause animal stress[J]. Lab Anim Sci, 2004, 43(6):42-51.
- [3] Li X, Stark GR. NF- κ B dependent signaling pathways[J]. Exp Hematol, 2002,30(4): 285-296.
- [4] Kumar A, Takada Y, Boriek AM, et al. Nuclear factor-kappa B: its role in health and disease[J]. Mol Med, 2004,82: 434-448.
- [5] 刘克嘉, 鄢勤娥. 应激与应激性疾病[M]. 北京:人民军医出版社,1991:54-56.
- [6] Van Loo PL, Van der Meer E, Kruitwagen CL, et al. Longterm effects of husbandry procedures on stressed related parameters in male mice of two strains[J]. Laboratory Animals, 2004, 38:169-177.
- [7] Sennenberg GE, Karkower GR, Kissebah AH. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome [J]. Obes Res, 2004,12: 180.
- [8] Neurath M F, Fuss I, Schurmann G, et al. Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease[J]. Ann NY Acad Sci, 1998, 859: 149.
- [9] Sennenberg GE, Karkower GR, Kissebah AH. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome [J]. Obes Res, 2004,12: 180.
- [10] Feinman R, Siegel IDS, Berenson J. Regulation of NF- κ B in multiple myeloma: therapeutic implications[J]. Clin Adv Hematol Oncol,2004,2:162-166.
- [11] Chakraborti S, Mandal M, Das S, et al. Regulation of matrix metalloproteinase: an overview [J]. Mol Cell Biochem,2003, 253 (1-2):269-285.
- [12] Li X, Stark GR. NF- κ B dependent signaling pathways [J]. Exp Hematol, 2002,30(4): 285-296.
- [13] Kumar A, Takada Y, Boriek AM, et al. Nuclear factor-kappa B: its role in health and disease[J]. Mol Med, 2004,82: 434-448.
- [14] Baumans V. Methods for evaluation of laboratory animal wellbeing [J]. Altern Lab Anim, 2004, 32(s1): 161-162.
- [15] 杜晓辉,姚咏明,李荣,等. 性别差异对脓毒症大鼠肝脏核因子- κ B 活化的影响[J]. 中国急诊医学杂志,2006,15(8): 679-682.
- [16] 嵇晴,杨建军,孙杰,等. 氯胺酮抑制内毒素诱导的核因子- κ B 及肿瘤坏死因子- α 的体内研究[J]. 医学研究学报,2005, 18(4):334-337.

[修回日期] 2015-09-16