

核因子 κ B的信号转导机制及研究策略

巨立中, 成军, 钟彦伟

巨立中, 成军, 钟彦伟, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039 国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九五”科技攻关项目 No.98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138, 军队“十五”科技攻关面上项目, No.01MB135.

项目负责人: 成军, 10039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

巨立中, 成军, 钟彦伟. 核因子 κ B 的信号转导机制及研究策略. 世界华人消化杂志 2004;12(4):948-950

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/948.asp>

0 引言

核因子 κ B (nuclear factor of κ B, NF- κ B) 是一种广泛存在的转录因子, 几乎每个真核细胞中都存在 NF- κ B, 不同的刺激信号激活该转录因子后, 参与相应的基因表达的调控, 如细胞的生长、分化、凋亡、炎症反应、肿瘤发生等^[1-2]. 由于其广泛的生物学活性, 对 NF- κ B 的研究为阐明某些疾病的发病机制及治疗具有重要的意义.

1 NF- κ B 的结构及信号转导机制

1986 年, Sen et al^[3]首次发现成熟浆细胞中存在与免疫球蛋白 κ 轻链基因的增强子序列特异性结合, 并促进 κ 链基因转录的核蛋白因子. 随后的研究发现, NF- κ B 是一种普遍存在的转录因子, 已发现有 150 多种物质可以激活 NF- κ B, 受 NF- κ B 调控的基因多达 150 种^[4]. 最初研究发现 NF- κ B 是由 p50 和 p65 两个亚单位组成的异二聚体, 后来发现存在有 NF- κ B 家族, 由于 NF- κ B 与 Rel 家族有较强的同源性, 所以又把 NF- κ B 与 Rel 合称为 Rel/NF- κ B 家族, 在哺乳类动物中已发现 Rel/NF- κ B 家族的 5 个成员: p65(RelA)、RelB、c-Rel、p50(NF- κ B1)、p52(NF- κ B2). 在大多数细胞中, p50 和 p65 是 NF- κ B 活性形式的主要成分, 所以通常所说的 NF- κ B 或 Rel/NF- κ B 即为 p50/p65 异源二聚体. NF- κ B 特异的结合位点是 κ B, 其 DNA 序列为 5'-GGGRNYYC C-3'(R 为任一嘌呤, Y 为任一嘧啶, N 为任一核苷酸), 该序列也称为 κ B 元件. NF- κ B 家族成员在 N-端有一个约 300 个氨基酸残基(aa)的高度保守的 Rel 同源区, 负责 NF- κ B 因子的二聚化、核定位易位、与 DNA 及 I κ B 结合. 根据 C-端的结构和功能不同, 将 NF- κ B 因子的组成肽链分为 p50 和 Rel 组, p50 组包括 p50、p52, 而 Rel 组包括 p65、RelB、c-Rel. p50 组成员的主要功能是结合 DNA, 不具有转录激活功能. Rel 组成员具有转录激活作用. p50 组成员和 Rel 组成员间形成的异源二聚体为转录激活复合物, 而 p50 组间形成的同源二聚体为转

录抑制复合物. 通常 NF- κ B 与 I κ B (inhibitory protein of NF- κ B) 结合. NF- κ B 的激活受其胞质抑制蛋白 I κ B 的调控, I κ Bs 与 NF- κ B 结合, 掩盖他的核定位信号, 从而使 NF- κ B 滞留在细胞质内, 处于无活性状态. I κ B 也是一种大的抑制分子家族, 包括 I κ B α 、I κ B β 、I κ B ε 、I κ B γ 、Bcl-3 和 Caltus(果蝇中)等成员, 它们的共同特点是在 C-端有锚蛋白(Ank)重复序列, 除了 Bcl ε 外, 其他 I κ B 成员有一个与降解有关的 PEST 区. Bcl ε 是唯一位于核内并促进 NF- κ B 转录, 而非抑制 NF- κ B 核易位的 I κ B 家族成员^[5-8]. 另外, Cohen et al^[9]在研究促炎症细胞因子激活 NF- κ B 的信号转导中, 分离到一个较大的白介素-1(IL-1)诱导的 IKK 复合物, IKK 是由 IKK α 、IKK β 和 IKK γ 三个亚单位组成的三聚体, IKK α 和 IKK β 共同有一个与降解有关的 kD 区和一个亮氨酸拉链(LZ), IKK α 、IKK β 和 IKK γ 三者功能不同, 且不可相互替代, IKK α 和 IKK β 为酶解功能单位, IKK γ 为调节单位, 负责对 IKK α 和 IKK β 的活性进行调节. NF- κ B 信号转导通路十分复杂, 多数认为是: 各种信号经由不同的方式激活 IKK, IKK 进一步将 I κ B 磷酸化, 例如 I κ B α 的磷酸化部位分别在 Ser32 和 Ser36, 而 I κ B β 的磷酸化部位在 Ser19 和 Ser23. 接下来在泛素连接酶的作用下, I κ B 上的某些 Lys 发生泛素化, 导致 I κ B 被 26S 的蛋白酶体水解, 于是受其抑制的 NF- κ B 得以释放, 发生核易位, 进入细胞核与相应的 κ B 位点结合, 启动特异的靶基因转录^[10].

2 NF- κ B 的研究策略

由于 NF- κ B 有多种功能, 其信号转导途径亦十分复杂, 对它的研究方法多种多样, 目前研究的主要目的在于阐明: 什么因子可以激活 NF- κ B; 什么因子可以抑制 NF- κ B 的激活? 这些因子是通过何种途径作用的? NF- κ B 被激活后用什么手段进行证实? 下文介绍几种常用的关于 NF- κ B 的研究策略, 根据实验目的, 可以单独应用, 但更多的是将几种方法结合使用.

2.1 转基因小鼠模型 Carlsen et al^[11]于 2000 年建立了一种转基因小鼠动物模型, 用来在体内动态观察 NF- κ B 的活性. 模型的构建方法为: (1) 将 Ig κ 轻链启动子基因(至少含 3 个 NF- κ B 的结合位点)与荧光素的荧光素编码基因相连构成 3 \times - κ B-luc 目的基因, 将该基因与质粒相连, 构成表达载体, 用 Hind III 和 Bgl I 使质粒载体线性化; (2) \varnothing 小鼠(C57BL/6J \times CBA/J)与 δ 小鼠交配, 取出受精卵, 用微注射法将线性化的质粒注入受精卵内, 将该受精卵植入假孕小鼠子宫内, 3 \times - κ B-luc 基因阳性的子代小鼠可用来作为模型; (3) 由于该转基因小鼠携带有 NF- κ B 控制的荧光素酶编码基因, 能使荧光素发光, 因此可根据不同的需要将完整的小鼠或部分器官与一特殊的显像系统相连, 先给小鼠注射 D- 荧光素, 再根据需要注射不同的 NF- κ B 激活物如肿瘤坏死因子 α (TNF α) 等, 用显像系统观察不同部位的光强度, 根

据光强度判断 NF- κ B 的活性. 他们的研究结果表明, 在无外界刺激的情况下, 小鼠的颈部淋巴结、胸腺、腹部集合淋巴结有强的发光, 用 TNF α , IL-1 α 或脂多糖(LPS)刺激小鼠后, 光强度明显增加且呈组织特异性, 即皮肤、肺、脾、小肠壁、腹腔集合淋巴结最强, 肝、肾、心、骨骼肌次之, 脂肪组织最弱. 进一步用紫外线照射皮肤或建立类风湿关节炎模型, 相应的皮肤区及受累关节光强度明显增加. 该模型用途广, 特异性好, 不仅用来阐明某些疾病的发病机制, 也可用来筛选抑制 NF- κ B 活性的药物, 如给小鼠注射 TNF α 之前注射地塞米松, 则相应部位的光强度未增加, 表明地塞米松能抑制 TNF α 激活 NF- κ B 的作用^[12-13].

2.2 抗体定位及酶学检测 如前所述, 刺激因子激活 NF- κ B, 其易位于核内, 与靶基因结合发挥作用. 检测 NF- κ B 是否定位于核内, 可判断 NF- κ B 是否被激活, 常用抗 p65 的单克隆抗体作为一抗, 用异硫氰酸荧光素标记的兔抗鼠抗体为二抗, 将细胞与抗体孵育后用免疫荧光分析法确定 p65 的位置, 将这一方法称为抗体定位法. Purcell et al^[14] 用 p65 单克隆抗体免疫荧光分析法检测到乙型肝炎病毒 X 蛋白(pX)能通过不依赖 IKK 的途径激活 NF- κ B. 该法简便易行, 但可靠性略差, 因此常将该法与酶学检测结合使用^[15-16]. 酶学检测的基本原理为: 将 Ig κ 链的基因片段(含 NF- κ B 的结合位点)与虫荧光素酶编码基因(报告基因)相连, 构建质粒表达载体, 将该载体转染细胞, 用刺激因子如 TNF α 激活 NF- κ B, 报告基因表达荧光素酶, 通过对该酶的检测, 可确定某因子是否激活 NF- κ B 及 NF- κ B 是否发挥转录调节作用. 将抗体定位与酶学检测结合使用, 不仅能确定 NF- κ B 是否易位入核内, 而且能得知 NF- κ B 是否发挥转录调节作用.

2.3 DNA 迁移率变动试验 DNA 迁移率变动试验(DNA mobility shift assay, EMSA), 又叫凝胶阻滞(gel retardation)试验, 是一种体外研究 DNA 与蛋白质相互作用的特殊的凝胶电泳技术. 基本原理为^[17]: 在凝胶电泳中, 由于电场的作用, 小分子 DNA 片段比其结合了蛋白质的 DNA 片段向阳极移动的速度快, 因此, 可标记短的双链 DNA 片段, 将其与蛋白质混合, 对混合物进行凝胶电泳, 若目的 DNA 与特异性蛋白质结合, 其向阳极移动的速度受到阻滞, 对凝胶进行放射性自显影, 就可证实特异性 DNA 与相应蛋白结合. 在进行 NF- κ B 研究中, 标记 Ig κ 轻链 DNA, 与特异性刺激因子刺激的细胞核提取物作用, 然后进行 DNA 迁移率变动试验, 若该刺激因子能激活 NF- κ B, 后者易位入细胞核内, 则核提取物中出现 NF- κ B, 标记的 DNA 与 NF- κ B 结合, 进行放射性自显影可发现二者结合及结合的位点, 反之亦然. 该实验已广泛用于 NF- κ B 的研究中^[18-21], 其不仅能证实某些疾病的发病与 NF- κ B 有关, 而且用于阻断 NF- κ B 活性的药物的筛选. Herfarth et al^[22]证实, 在葡聚糖硫酸钠(dextran sulphate sodium)激活 NF- κ B 后所

致小鼠的结肠炎发病中, NF- κ B 的激活可被胶毒霉素(gliotoxin)阻断, 因而认为胶毒霉素是有希望的治疗结肠炎的药物.

2.4 显负性突变体的应用 显负性突变是基因的构成突变, 这种突变体基因表达有缺陷的产物, 即表达产物可与野生型基因表达产物结合, 但结合后使野生型基因表达产物失去激活作用^[23]. 显负性突变体在 NF- κ B 信号转导研究中应用十分广泛, 显负性突变体主要用来做对照, 根据实验目的, 可构建多种显负性突变体^[23-27]. 如为阐明某刺激因子是否通过 IKK 途径激活 NF- κ B, 可构建该因子的显负性突变体作对照, 将突变型因子及野生型因子分别与 IKK 作用, 以观察刺激因子能否通过 IKK 途径激活 NF- κ B. Nemoto et al^[28]为了研究有丝分裂原激活蛋白激酶激酶 1(mitogen-activated protein kinase kinase 1, MEKK1)对 IKK 复合体的激活作用, 构建了 MEKK1 的显负性突变体, 经实验证实, 野生型 MEKK1 对 IKK 有激活作用, 而显负性突变体 MEKK1 不仅不能激活 IKK, 而且有阻碍 TNF α 激活 IKK 的作用.

3 参考文献

- Heyninck K, Krike MM, Beyaert R. Structure-function analysis of the A20-binding inhibitor of NF- κ B activation, ABIN-1. *FEBS Letters* 2003;536:135-140
- Nair A, Venkatraman M, Malieka TT, Nair B, Karunakaran D. NF- κ B is constitutive activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. *Oncogene* 2003;22:50-58
- Sen R, Baltimore D. Inducibility of Kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-Kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986;47:921-928
- Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-KappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853-6886
- Chen X, Shen B, Xia L, Khaletzkij A, Cheu D, Wong DCJ, Li LL. Activation of nuclear KB in radioresistance of TP53-inactive human keratinocytes. *Cancer Res* 2002;62:1213-1221
- Karin M. How NF-Kappa B is activated: the role of the kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999;49:6867-6874
- Baeuerl PA, Baltimore D. NF-kappa B ten years after. *Cell* 1996;87:13-20
- Stancovski I, Baltimore D. NF-kappaB activation: the I kappaB complex. *Cell* 1997;91:299-302
- Cohen L, Henzel WJ, Baeuerle PA. IKPA is a scaffold protein of the I kappaB complex. *Nature* 1998;395:292-296
- Huffel SV, Delaei F, Heyninck K, Valck DD, Beyaert R. Identification of a novel A20-binding inhibitor of nuclear factor-KB activation termed ABIN-2. *J Biol Chem* 2001;276:3026-30223
- Carlsen H, Moskaug J, Fromm SH, Blohoff R. In vivo imaging of NF-KB activity. *J Immunol* 2002;168:1441-1446
- Lernbecher T, Muller U, Wirth T. Distinct NF-kappa B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. *Nature* 1993;365:767-770
- Blackwell TS, Yull FE, Chen CL, Venkatakrishnan A, Blackwell TR, Hicks DJ, Lancaster LH, Christman JW, Kerr LD. Multiorgan nuclear factor kappa B activation in a transgenic mouse model of systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1095-1101
- Purcell NH, Yu C, He D, Xiang J, Paran N, DiDonato JA, Yamaoka S, Shaul Y, Lin A. Activation of NF-kappaB by hepatitis B virus X protein through an IkappaB kinase-independent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G669-G677
- Kwon JA, Rho HM. Hepatitis B viral core protein activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter through

- the nuclear factor kappaB binding site. *Biochem Cell Biol* 2002; 80:445-455
- 16 DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 1997;388:548-554
- 17 Weaver RF. Molecular biology. 2 ed. 北京:科学出版社, 2002: 124-127
- 18 Haversen L, Ohlsson BG, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Mattsby-Baltzer I. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF- κ B. *Cell Immunol* 2002;220:83-95
- 19 Arlt A, Vorndamm J, Muerkoster S, Yu H, Schmidt WE, Folsch UR, Schafer H. Autocrine production of interleukin 1 β confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2002;62:910-916
- 20 Kabouridis PS, Hasan M, Newson J, Gilroy DW, Lawrence T. Inhibition of NF- κ B activity by a membrane-transducing mutant of I κ B α . *J Immunol* 2002;9:2587-2593
- 21 Chiao PJ, Na R, Niu J, Sclabas GM, Dong Q, Curley SA. Role of Rel/NF- κ B transcription factors in apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer* 2002;95:1696-1705
- 22 Herfarth H, Brand K, Rath HC, Rogler G, Scholmerich J, Falk W. Nuclear factor- κ B activity and intestinal inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice is suppressed by gliotoxin. *Clin Exp Immunol* 2000;120:59-65
- 23 Weaver RF. Molecular biology. second ed. 北京:科学出版社, 2002:178-181
- 24 Swantek JL, Christerson L, Cobb MH. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α promoter activity is inhibitor of nuclear factor- κ B kinase-dependent. *J Biol Chem* 1999;274: 11667-11671
- 25 Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 1997;278:1612-1615
- 26 Berenson JR, Ma HM, Vescio R. The role of nuclear factor- κ B in the biology and treatment of multiple myeloma. *Semin Oncol* 2001;28:626-633
- 27 Kibbe MR, Johnnides C, Gleixner S, Kovesdi I, Lizonova A, Zuckerbraun B, Billiar TR, Tzeng E, Muluk SC. Regulation of tissue factor expression in smooth muscle cells with nitric oxide. *J Vasc Surg* 2003;37:650-659
- 28 Nemoto S, DiDonato JA, Lin A. Coordinate regulation of I κ B kinases by mitogen-activated protein kinase kinase 1 and NF- κ B-inducing kinase. *Mol Cell Biol* 1998; 18:7336-7343

细胞色素CYP II E1与肝脏疾病关系的研究进展

王春花, 成军, 郎振为, 吴煜, 杨艳杰, 纪冬, 党晓燕

王春花, 成军, 刘煜, 杨艳杰, 纪冬, 党晓燕, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
郎振为, 首都医科大学佑安医院病理科 北京市 100050
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目 No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135.
项目负责人: 成军, 10039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

王春花, 成军, 郎振为, 吴煜, 杨艳杰, 纪冬, 党晓燕. 细胞色素CYP II E1与肝脏疾病关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(4):950-954
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/950.asp>

0 引言

在肝细胞微粒体内有1个氧化还原酶系统, 由多种水解酶和结合酶组成. 这个酶系统在生理情况下, 可以促进生理活性物质的灭活和排泄, 另一方面也可以促进药物代谢, 所以又叫药酶. 细胞色素P450是药酶中的一种多功能氧化还原酶, 他可以使药物的烃基及芳香基羟化, 使硝基及偶氮化合物还原成氨基, 因他的一氧化碳结合物的吸收光谱高峰在450 nm处, 故叫P450. P450是肝药酶中最重要的酶系, 参与各种外源物(如药物、化学毒物、致癌物等)和内源物(如类固醇激素、维生素D、胆酸等)在体内代谢过程. P450中现已有70多种药物代谢酶分别催化不同物质的生物转化. 其中细胞色素P450 II E1(CYP II E1)是二甲基亚硝胺D-脱甲基酶, 主要在肝脏表达, 一些疏水性的外来物质经CYP II E1转化后形成极性更大的物质排出体外, 而有时可能被转化为细胞毒、致癌、致突变作用更强的物质, 例如他代谢酒精、四氯化碳、对乙酰氨基酚等, 生成毒性更大的物质; 代谢乙醇生成活性氧基, 产生肝毒性, 因此生物学效应具有双面性^[1]. 越来越多的研究表明CYP II E1与各种肝病的关系密切.

1 CYP II E1

1.1 CYP II E1的分布和基因结构 1987年Wrighton et al同时从人的肝微粒体分离纯化出CYP II E1并分别命名为P450HLj和P450ALC. 其与先前在兔和大鼠肝微粒体中发现的CYP II E1的氨基酸序列约有80%是相同的, 彼此间的活性非常相似, 并且迄今发现的作用底物在人和动物中也是相同的^[2], 这为利用动物替代人类进行实验研究提供了可行性具有重要的科研意义. 人的CYP II E1主要分布于成人肝脏并富集于肝小叶中心区域, 近年陆续发现在鼻腔、食管、胃、小肠、结肠、肺、肾和皮肤等许多肝外组织器官有不同程度的表达. CYP II E1的分子量为56.9 KDa, 基因定位于第10号染色体上, 其大小为11.4 kb, 由9个外显子和8个内显子, 一个典型的TATA盒子组成, 编码493个氨基酸残基(aa)的蛋白, 他的全部序列及其上游的2 788 bp和下游的559 bp的顺序^[3].

1.2 CYP II E1的基因多态性 CYP II E1的个体差异大, 体外用免疫学方法检测发现可达50倍, 同一个体受到诱导激活前后差别也较大, 例如酒精代谢中除了酒精脱氢酶为主要系统, 他如同血型一样终生不会改变, CYP II E1系统占酒精代谢能力的15%左右, 而且可以被激活, 一般所谓酒量愈练愈大, 就是和这个代谢途径有关. 此外该酶也存在显著种族差异, 如日本人美国黑人^[4]均明显低于美国白人. 这些差异可能与遗传因素有关, 因为CYP II E1存在6种限制性内切酶片段长度多态性(RFLP), 即Taq I、Dra I、Rsa I和Msp I RFLP, 以及5'-端的Pst I和Rsa I RFLP^[5], 其中Dra I的5'-端的Pst I和Rsa I在转录水平影响CYP II E1的