

Bmi-1 通过下调 NF- κ B 信号通路防治小鼠萎缩性胃炎

夏鑫, 靳建亮, 左国平, 任子健*

南京医科大学人体解剖学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:明确 Bmi-1 是否有防治萎缩性胃炎的作用及其机制。方法:针对 7 周龄 Bmi-1 基因缺失(Bmi-1 knock out, BKO)纯合子小鼠和同窝野生型(wild type, WT)小鼠,利用组织学切片、免疫组织化学和 Western blot 比较分析胃的表型差异。结果:与 WT 小鼠相比,BKO 小鼠表现为胃壁变薄、腺体萎缩和炎症浸润的萎缩性胃炎表型。免疫组化结果显示白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)阳性细胞面积和核因子- κ B-p65(nuclear factor- κ B-p65, NF- κ B-p65)阳性细胞数明显增加;Western blot 结果显示 IL-6、TNF- α 和 NF- κ B-p65 蛋白表达水平明显升高。结论:在小鼠中,Bmi-1 可通过下调 NF- κ B 信号通路防治萎缩性胃炎。

[关键词] Bmi-1;基因敲除小鼠;萎缩性胃炎;NF- κ B 信号通路

[中图分类号] R573.32

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)09-1208-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20180907

Bmi-1 protects mice from atrophic gastritis by down-regulating NF- κ B signaling pathway

Xia Xin, Jin Jianliang, Zuo Guoping, Ren Zijian*

Department of Human Anatomy, NMU, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of Bmi-1 in preventing atrophic gastritis in mice. **Methods:** The phenotype of stomach was compared between wild-type and Bmi-1 gene knock-out mice at 7 weeks of ages by histology, immunohistochemistry and Western-blot. **Results:** Bmi-1 gene knock-out mice displayed thin gastric wall, inflammatory infiltration in gastric mucosa and atrophy of gastric gland. The expression of interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α) and nuclear factor- κ B-p65(NF- κ B-p65) is up-regulated in Bmi-1 knock-out mice. **Conclusion:** Bmi-1 could protect mice from atrophic gastritis by down-regulating NF- κ B signaling pathway.

[Key words] Bmi-1; gene knock-out mice; atrophic gastritis; NF- κ B signaling pathway

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(09): 1208-1211]

B 细胞淋巴瘤滤过性病毒插入位点 1(B cell specific moloney leukemia virus insert site-1, Bmi-1)属于聚硫蛋白复合体基因家族的成员之一。具有抑制转录的作用,之前被认为是一种原癌基因^[1]。后来研究发现,Bmi-1 基因在延缓细胞衰老中发挥重要作用,Bmi-1 通过抑制细胞周期蛋白激酶抑制子 p16 和 p19 基因转录,防止细胞周期停滞引起的细胞成熟前衰老^[2-3],另外,Bmi-1 还可以通过维持细胞线粒体功能及氧化还原平衡,降低活性氧(reac-

tive oxygen species, ROS)水平,进而防止细胞 DNA 损伤及其反应,阻止细胞早衰^[4],对于个体而言,Bmi-1 小鼠出现生长阻滞、发育缓慢等成熟前衰老表现。此前本课题组通过对 Bmi-1 基因缺失(Bmi-1 knock out, BKO)小鼠的多器官组织研究发现,该小鼠出现淋巴系统成熟障碍、骨质疏松、肾小管间质纤维化、皮肤衰老等发育障碍和衰老相关表现^[5-7],为临床上衰老相关疾病提供防治依据。但目前尚未对影响小鼠食物消化的消化器官——胃做过深入研究。预实验结果显示 Bmi-1 缺失小鼠胃黏膜皱襞减少、胃壁变薄。

临床上,慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是以胃黏膜炎症、胃腺体萎缩或减少为

[基金项目] 国家自然科学基金(81571371)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: renzijian@njmu.edu.cn

病理特征的消化系统常见病,是癌前病变的一种,常见于中老年人,70%的患者年龄在40岁以上^[8],常见临床症状有腹痛、腹胀、腹部不适和食欲不振等,可伴贫血、消瘦等表现。目前CAG机制尚未被完全阐释,临床上多以对症治疗为主,效果不佳。

因此,为了明确Bmi-1是否发挥抑制胃黏膜炎症及腺体萎缩等萎缩性胃炎表型的作用及其机制,针对7周龄Bmi-1基因缺失纯合子小鼠和同窝野生型小鼠,利用组织学切片、免疫组化和Western blot比较分析了胃表型差异。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究中所有实验小鼠均由南京医科大学SPF级实验动物中心饲养。本研究采用Bmi-1基因敲除杂合子小鼠(Bmi-1^{+/-})(129Ola/FVB/N杂交背景)(由荷兰肿瘤研究所Anton Berns教授惠赠),进行雌雄配对合笼,以获得野生型和Bmi-1基因敲除纯合子小鼠,子代小鼠通过多聚酶链反应(PCR)进行基因型鉴定^[9]。本研究选用出生后7周龄同窝野生型和Bmi-1基因敲除纯合子小鼠各6只,雌雄不限,分为WT组和BKO组。本研究的动物实验严格遵循南京医科大学动物实验管理规定,经动物实验伦理委员会审核,批准编号为IACUC-1706001。

1.2 方法

1.2.1 小鼠基因型鉴定

小鼠鼠尾片段用酚-氯仿-异戊醇的方法抽提DNA,通过PCR方法进行基因型鉴定,Bmi-1的正向引物序列为:5'-CAGTTAGGCAGTATGTAGTTTTTC-3',反向引物为5'-GTTGTGGTGGAGTGTAAGAGTGT-3',NEO基因的正向引物为:5'-AAGATGTTGGC-GACCTCGTATTGG-3',反向引物为:5'-GCAAGACCTGCCTGAAACCGAACT-3'。所有引物均由美国Invitrogen公司合成。Taq酶购自北京宝日生物技术有限公司。PCR反应条件:94℃预变性4min;94℃变性30s,57℃退火30s,72℃延伸45s,共进行30循环;72℃延伸10min。使用Bio-Rad Mycycler PCR扩增仪。Bmi-1扩增产物为687bp,NEO扩增产物399bp。仅有Bmi-1扩增产物为687bp条带为野生型,仅有Neo扩增产物399bp条带为纯合子,2条扩增产物均有者为杂合子(图1)。

1.2.2 组织提取

取出生后7周的WT和BKO小鼠,雌雄不限,乙醚麻醉,由前正中线切开腹壁,从贲门、幽门截断,

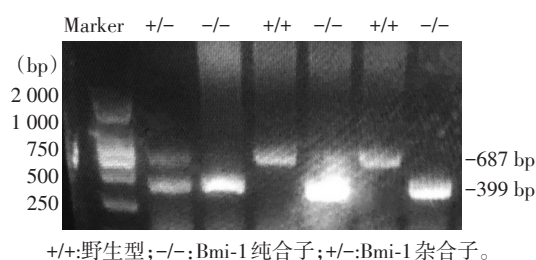


图1 小鼠的基因型鉴定

Figure 1 Identification of genotype of mice

取出胃,将胃体分为2份,分别用于组织切片和提取蛋白进行Western blot实验。

1.2.3 HE染色和免疫组织化学染色

用于切片的组织经多聚甲醛固定后,常规脱水,石蜡包埋,切片进行HE染色和免疫组织化学染色。石蜡切片常规脱蜡水化,苏木精(Sigma公司,美国)染色,1%盐酸酒精分化,流水冲洗返蓝,伊红(Sigma公司,美国)复染,常规脱水透明,中性树胶封片。

石蜡切片经常规脱蜡水化以后,用3% H₂O₂处理10min,5%正常兔血清封闭20min,分别加核因子- κ B-p65(nuclear factor- κ B-p65, NF- κ B-p65)抗体(Cell Signaling公司,美国)、白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)抗体(Santa公司,美国)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)抗体(Santa公司,美国)室温过夜,加羊抗小鼠(1:100,武汉博士德公司)室温20min,加DAB溶液(武汉博士德公司)室温避光孵育5~8min,苏木精复染1min,常规脱水透明,中性树胶封片,光镜观察,摄片。

1.2.4 Western blot实验

组织按质量/体积约1:20加入RIPA后匀浆,冰上静置30min,13000 r/min 4℃离心15min,提取蛋白并定量。做SDS-PAGE,用转移电泳槽300mA恒流2h,于4℃将凝胶中的蛋白质转移置NC膜上,PBST洗涤10min×3次;加封闭液,37℃封闭2h;加入适量一抗(NF- κ B、IL-6、TNF- α , 1:100)4℃孵育过夜;PBST洗涤10min×3次后加入二抗,37℃孵育45min。NC膜用PBST充分洗涤后加入ECL(化学发光剂),在暗房中以X线胶片曝光,显影,定影。胶片晾干后用扫描仪采集阳性条带,分析其积分光密度值。

1.3 统计学方法

所有HE染色和免疫组化染色均由莱卡数码显微镜拍摄,并使用Northern Eclipse图像分析软件进行定量分析。数据使用SPSS 10.0软件进行组间单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Bmi-1 基因缺失导致小鼠胃腺体萎缩

与同窝 WT 小鼠相比,肉眼观察可见 7 周龄 BKO 小鼠体形较小,体重较轻,充盈状态下胃相对较小,剖开胃可见胃黏膜皱襞减少,炎症浸润样改变(图 2A、B)。BKO 小鼠与 WT 小鼠 HE 染色结果显示:与 WT 小鼠相比,BKO 小鼠胃壁厚度明显变薄($P < 0.05$),腺体明显萎缩,腺体间有炎性细胞浸润(图 3)。

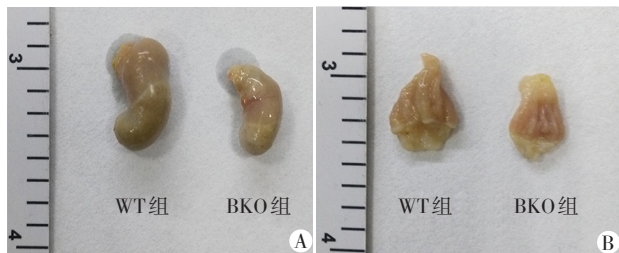
2.2 Bmi-1 基因敲除导致胃黏膜炎症浸润

为了明确 Bmi-1 基因缺失引起的胃组织学相关

表现是否与炎症浸润有关,通过免疫组织化学染色与 Western blot 检测了胃组织中炎症介质 IL-6 和 TNF- α 的表达情况。结果发现:与 WT 小鼠相比,BKO 小鼠胃黏膜中,炎症介质 IL-6、TNF- α 阳性细胞面积及蛋白表达水平明显增高($P < 0.05$,图 3,4)。NF- κ B 作为经典的促炎信号通路,为观察 BKO 小鼠胃中 NF- κ B 信号通路是否被激活,通过免疫组化与 Western blot 检测了 WT 和 BKO 小鼠胃中 NF- κ B-p65 表达。结果显示:BKO 小鼠胃中,NF- κ B-p65 阳性细胞数及蛋白表达水平都较同窝 WT 小鼠明显增高($P < 0.05$,图 3,4)。

3 讨论

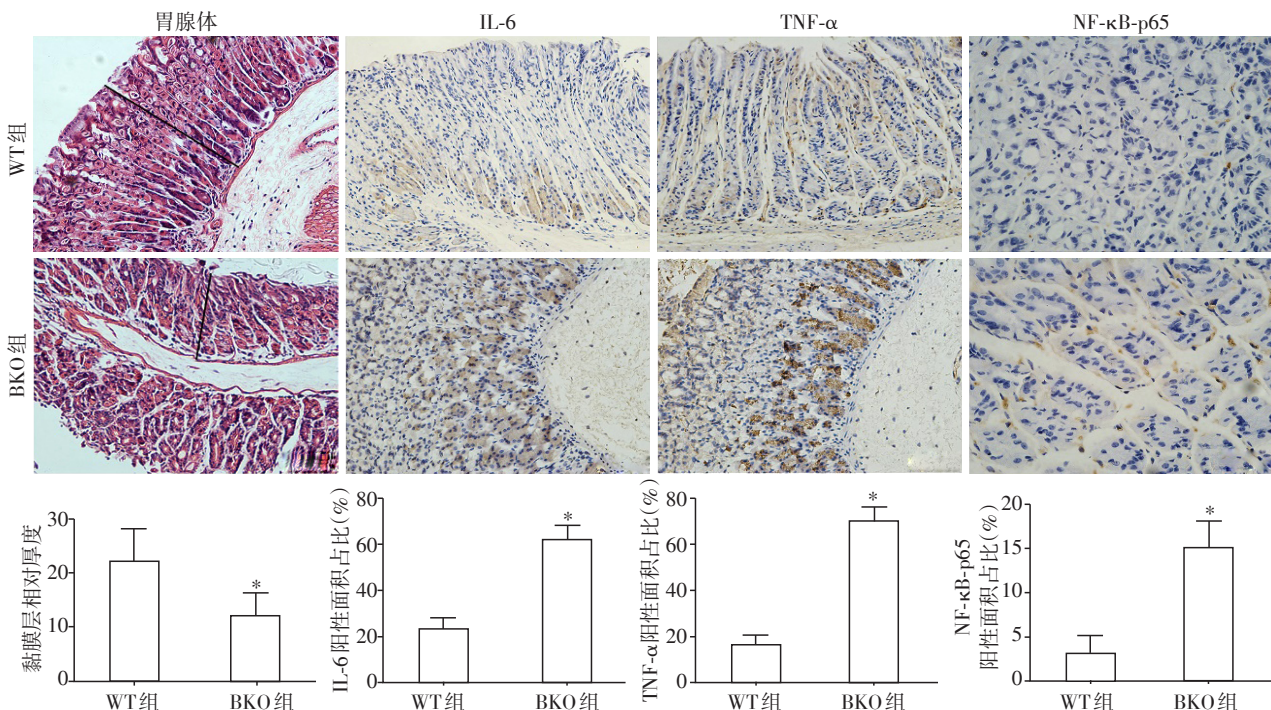
目前本课题组培养的 Bmi-1 基因敲除纯合子小鼠出生后生长阻滞,发育迟缓,生存周期 8~9 周,已有研究分析,Bmi-1 基因敲除后会出现肾小管间质炎、皮肤功能障碍、骨骼发育问题等^[5-7],基因敲除小鼠具体死因尚不明确,以上各个器官水平表现均可对最终小鼠个体死亡起作用。胃若存在衰老相关表现,对于小鼠生长缓慢及最终死亡将会起到重要作用。本研究利用 BKO 小鼠模型观察 Bmi-1 基因缺失对小鼠胃组织的影响。取出小鼠胃可见充盈状态



A: 小鼠胃对比;B: 小鼠胃黏膜对比。

图 2 Bmi-1 基因敲除后小鼠胃及胃黏膜发生的变化

Figure 2 The difference between WT mice and BKO mice in phenotype of stomach and gastric mucosa



WT 小鼠与 BKO 小鼠比较,可见 BKO 小鼠胃腺体萎缩,黏膜层厚度变薄(HE, $\times 200$),与 WT 组比较, $^*P < 0.05$; BKO 小鼠胃中 IL-6 表达明显增高(免疫组化, $\times 200$),与 WT 组比较, $^*P < 0.05$; TNF- α 表达明显增高(免疫组化, $\times 200$),与 WT 组比较, $^*P < 0.05$; NF- κ B-P65 表达亦明显增高(免疫组化, $\times 400$),与 WT 组比较, $^*P < 0.05$ 。

图 3 Bmi-1 缺失导致小鼠胃黏膜炎症浸润、胃腺体萎缩

Figure 3 Bmi-1 deficiency lead to inflammatory infiltration in gastric mucosa and atrophy of gastric gland

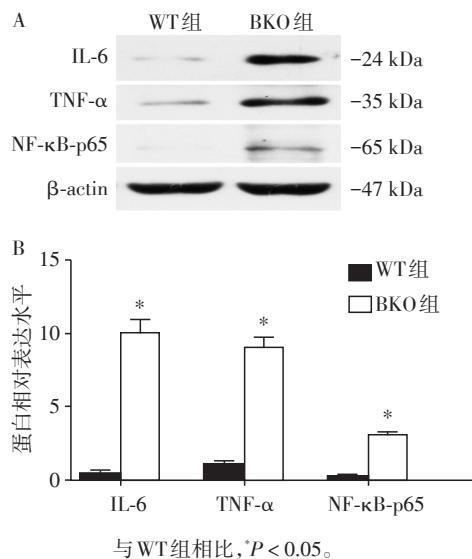


图4 IL-6、TNF-α、NF-κB-p65蛋白在野生型和Bmi-1基因敲除纯合子小鼠中的表达
Figure 4 The expression of IL-6, TNF-α, NF-κB-p65 protein in wild type mice and Bmi-1 knock out mice

下BKO小鼠胃均小于野生型小鼠,剖开胃展开胃黏膜,可见胃黏膜表面皱襞较野生型少,红白相间疑似炎症浸润,光学显微镜下观察HE染色切片可见BKO小鼠胃黏膜层明显变薄($P < 0.05$),胃腺体明显萎缩,从而证实Bmi-1基因缺失会导致小鼠胃腺体萎缩表现,影响小鼠胃的消化功能。为进一步探讨Bmi-1基因缺失引起胃腺体萎缩是否与炎症介质浸润有关,本研究检测了炎症介质IL-6、TNF-α及NF-κB-p65,结果发现在BKO小鼠胃黏膜中,炎症介质阳性面积分别提高了35% ($P < 0.05$)和55% ($P < 0.05$),炎症表现明显,NF-κB-p65在BKO小鼠中的表达水平明显升高($P < 0.05$),提示胃黏膜中的Bmi-1缺失会导致NF-κB信号通路激活,从而导致炎症介质浸润,IL-6和TNF-α又可作为信号分子进一步激活NF-κB信号通路引起恶性循环^[10-12],最终导致胃腺体萎缩,进而导致胃酸分泌减少,胃消化功能障碍,并影响敲除鼠整体发育和生长。

本研究提示在野生型小鼠中Bmi-1基因会抑制NF-κB信号通路表达从而防止小鼠胃黏膜炎症浸润、胃腺体萎缩等萎缩性胃炎表现。临床上老年人CAG发生率较高,且随着年龄增长发病率逐步升高,其诱因众多,有幽门螺旋杆菌感染、胆汁反流、自身免疫因素等,但最终导致胃腺体萎缩和减少,均与他们诱导的炎症浸润有关^[8]。这类炎症浸润是否与衰老相关因素密切联系,有待进一步研究,因此进一步以Bmi-1

基因为靶点深入研究,明确其在CAG发病机制中的作用,可为临床CAG的防治提供新思路。

[参考文献]

- [1] Bhattacharya R, Mustafi SB, Street M, et al. Bmi-1: At the crossroads of physiological and pathological biology [J]. *Genes Dis*, 2015, 2(3): 225-239
- [2] Gao FL, Li WS, Liu CL, et al. Silencing Bmi-1 enhances the senescence and decreases the metastasis of human gastric cancer cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(46): 8764-8769
- [3] Zheng X, Wang Y, Liu B, et al. Bmi-1-shRNA inhibits the proliferation of lung adenocarcinoma cells by blocking the G1/S phase through decreasing cyclin D1 and increasing p21/p27 levels [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2014, 24(3): 210-216
- [4] Ismail IH, Gagne JP, Caron MC, et al. CBX4-mediated SUMO modification regulates BMI1 recruitment at sites of DNA damage [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(12): 5497-5510
- [5] Jin J, Lv X, Chen L, et al. Bmi-1 plays a critical role in protection from renal tubulointerstitial injury by maintaining redox balance [J]. *Aging Cell*, 2014, 13(5): 797-809
- [6] Xie C, Jin J, Lv X, et al. Anti-aging effect of transplanted amniotic membrane mesenchymal stem cells in a premature aging model of Bmi-1 deficiency [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 13975
- [7] 黄元清, 苗登顺, 陈宁. 吡咯喹啉醌对Bmi-1基因缺失引起小鼠皮肤早衰的保护作用 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(6): 691-696
- [8] 陈佳, 李守英, 徐红. 慢性萎缩性胃炎的研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(14): 3540-3542
- [9] Jin J, Tao J, Gu X, et al. P16 INK4a deletion ameliorated renal tubulointerstitial injury in a stress-induced premature senescence model of Bmi-1 deficiency [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7502
- [10] Tang D, Tao D, Fang Y, et al. TNF-alpha promotes invasion and metastasis via NF-Kappa B pathway in oral squamous cell carcinoma [J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2017, 23: 141-149
- [11] Lee YS, Kim MS, Lee DH, et al. Luteolin 8-C-beta-fucopyranoside downregulates IL-6 expression by inhibiting MAPKs and the NF-kappaB signaling pathway in human monocytic cells [J]. *Pharmacol Rep*, 2015, 67(3): 581-587
- [12] Jing W, Chunhua M, Shumin W. Effects of acteoside on lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury via regulation of NF-kappaB pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 285(2): 128-135

[收稿日期] 2017-12-19