

· 论 著 ·

新生鼠败血症肺脏核因子- κ B 表达

潘风, 史源, 李华强, 覃世文, 唐仕芳, 赵锦宁

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所儿科, 重庆 400042)

[摘 要] **目的** 探讨 NF- κ B 信号途径在新生鼠败血症中的作用, 为临床寻求以 NF- κ B 为靶点的治疗手段提供实验依据。**方法** 应用 10 d 新生大鼠制备金黄色葡萄球菌败血症模型。采用电泳迁移率改变分析(EMSA)方法检测败血症新生鼠肺脏 NF- κ B 的表达情况和应用吡咯-硫氨基甲酸酯(PDTC)后肺脏 NF- κ B 活性变化情况。**结果** 金黄色葡萄球菌败血症新生鼠的肺脏 NF- κ B 活性于注菌后 1 h 开始增强, 3 h 达高峰。PDTC 对肺脏 NF- κ B 活化有抑制作用, 且剂量越大, 抑制作用越强。**结论** 新生鼠金黄色葡萄球菌败血症时肺脏 NF- κ B 有明显激活, 且存在一高峰期。抗氧化剂 PDTC 能对金黄色葡萄球菌败血症新生鼠肺脏 NF- κ B 活化有所抑制, 且存在量-效依赖关系。

[中国当代儿科杂志, 2003, 5(5): 421-424]

[关 键 词] 核因子- κ B; 败血症; 肺; 吡咯二硫氨基甲酸酯; 新生鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2003)05-0421-04

Activity of Nuclear Factor- κ B in the Lungs of Newborn Rats with Sepsis

Feng PAN, Yuan SHI, Hua-Qiang LI, Shi-Wen QIN, Shi-Fang TANG, Jin-Ning ZHAO. Department of Pediatrics, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China (Email: pfmail@xinhuanet.com)

Abstract: **Objective** To study the role of NF- κ B signal pathway in neonatal rats with sepsis so as to provide the experimental base for corresponding clinical treatment of sepsis, in which NF- κ B is taken as the target. **Methods** The sepsis model was established by injecting staphylococcus aureus subcutaneously in 10-day-old newborn rats. The activity of NF- κ B in the lungs of newborn rats with staphylococcus aureus sepsis was detected by the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and the effect of anti-oxidant pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) on it was studied. **Results** In newborn rats with staphylococcus aureus sepsis, the activity of lung NF- κ B was enhanced at the 1st h and reached a peak at the 3rd h after injection of staphylococcus aureus. PDTC had an inhibitive effect on the activity of lung NF- κ B. The larger the dosage, the more intensified the inhibitive effect. **Conclusions** In newborn rats with staphylococcus aureus sepsis, the NF- κ B of lungs is activated, and the activation of NF- κ B has a peak. The anti-oxidant PDTC can inhibit lung NF- κ B activity in a dose-effect way in newborn rats with staphylococcus aureus sepsis.

[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(5): 421-424]

Key words: NF- κ B; Sepsis; Lung; Pyrrolidine dithiocarbamate; Newborn rat

败血症是威胁新生儿健康的重要疾病。目前研究显示, 新生儿败血症时, 血浆中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、急性期反应蛋白(CRP)、白细胞介素 IL-6, IL-1 β , IL-8 水平均明显升高^[1,2]。这些研究显示细胞因子和化学因子在新生儿败血症中参与其发病机制, 在炎症过程中常常同时产生并协同作用, 构成一个复杂的细胞因子网络。如果能对细胞因子网络进行调节, 则可能减少败血症对机体造成的损害。

有研究表明, 多种炎症介质基因的启动子和增强子中存在一个或多个 κ B 序列, 活化的核因子- κ B (NF- κ B) 可单独或其他转录因子协同, 通过影响细胞因子网络中的多种细胞因子基因的转录而对细胞因子网络产生广泛影响^[3]。

我们采用电泳迁移率改变分析(EMSA)方法检测金黄色葡萄球菌败血症新生鼠肺脏 NF- κ B 的表达水平及抗氧化剂吡咯二硫氨基甲酸酯(PDTC)对

[收稿日期] 2003-01-18; [修回日期] 2003-04-07

[作者简介] 潘风(1971-), 女, 硕士, 主治医师。主攻方向: 新生儿疾病。

[通讯作者] 潘风, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所儿科, 邮编: 400042。

金黄色葡萄球菌败血症新生鼠肺脏 NF- κ B 活性的影响。试图探讨 NF- κ B 信号途径在新生儿败血症中的作用,为临床寻求以 NF- κ B 为靶点的治疗手段提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供的 10 d 新生 Wistar 大鼠。

1.2 方法

1.2.1 新生鼠败血症早期动物模型的制备及取材

出生 10 d 新生鼠皮下注射金黄色葡萄球菌(10^9 CFU/只,第三军医大学微生物教研室提供)制备败血症模型,模型制备后分别观察到注菌后 1,2,3,4,5,6,7,8,24 h,对照组为正常 10 d 新生鼠,各组动物均为 3 只。在相应的时间心脏穿刺抽取鲜血作培养及取肺脏组织,所取组织标本 -70°C 低温冰箱冷冻保存备用。

1.2.2 PDTC 动物模型的制备及取材 将 10 d 新生鼠随机分为 4 组(每组 3 只),雌雄不拘,体重 18 ~ 25 g: ① PDTC 200 mg/kg; ② 细菌 + PDTC 50 mg/kg; ③ 细菌 + PDTC 100 mg/kg; ④ 细菌 + PDTC 200 mg/kg。分别按相应剂量腹腔内注射 PDTC 1 h 后,皮下注射金黄色葡萄球菌制备败血症模型。注射金黄色葡萄球菌 3 h 后取材,方法同前。

1.2.3 核蛋白的提取 所取组织加入匀浆缓冲液制成匀浆,过滤,制成单细胞悬液;离心,收集沉淀。悬浮细胞于适量 Buffer A(10 mmol/L HEPES-KOH, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L PMSF)中, 0°C 放置 10 min,离心,收集沉淀;沉淀垂悬于适量 Buffer B(20 mmol/L HEPES-KOH, 25% 甘油, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 420 mmol/L NaCl, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L PMSF)中,充分混匀, 0°C 放置 30 min;离心,上清为核抽提物。吸取上清,紫外分光光度仪上定量,分装, -70°C 保存。

1.2.4 DNA 标记探针的制备及电泳迁移率改变分析(EMSA) 含 κB 序列 GGGACTTTCC 的双链寡核苷酸变性为单链后,在 T_4 寡核苷酸激酶催化下,用 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP 标记探针 5' 端,经氯仿/苯酚 1:1 混合液抽提,乙醇沉淀,用 TE 溶解, -20°C 保存。

EP 管中取对应的核蛋白 5 μg ,依次加入 $5\times$ 结合缓冲液 4 μl 和 Poly(dI-dC) 1 μl ,用去离子水补足至 19 μl 。混匀,每管加入 1 μl 标记好的探针,混匀

后置室温 30 min;6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,压片, -70°C 低温冰箱内放射自显影。取 3 次 EMSA 显影照片进行光密度值扫描。

1.3 统计学分析

计量资料均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 10.0 软件,多样本均数比较采用 Student-Newman-Keuls 方法进行统计学分析。

2 结果

2.1 新生鼠败血症模型鉴定

新生鼠抽血所做血培养有金黄色葡萄球菌生长者为败血症标本来源。

2.2 新生鼠败血症肺脏 NF- κ B 表达情况

在新生鼠金黄色葡萄球菌败血症模型,注菌 1 h 后肺组织中即出现 NF- κ B 活化,3 h 达高峰,4 h 后活化逐渐减弱,第 8 h 仍可见较弱的活化 NF- κ B,24 h NF- κ B 表达情况与对照组相近。见图 1,2。

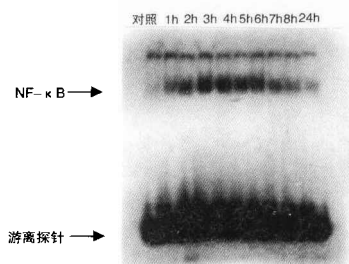


图1 对照组及败血症模型不同时间点 NF- κ B 活性

Figure 1 Activity of NF- κ B in the control group and septicemia model at different time points

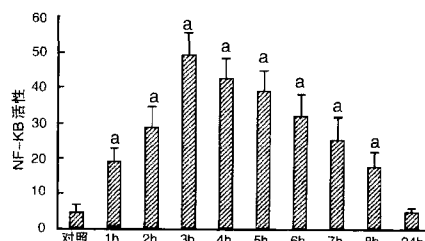


图2 对照组及败血症模型不同时间点 NF- κ B 活性的扫描结果

注:a 与正常对照组比较 $P < 0.01$

Figure 2 Scan results of the activity of NF- κ B in the control group and septicemia model at different time points

Note: a vs the control group $P < 0.01$

2.3 PDTC 对新生鼠败血症肺脏组织 NF- κ B 活性的影响

单独应用 PDTC 组肺脏 NF- κ B 激活不明显,应

用PDTC的败血症新生鼠肺脏组织中NF- κ B的活性抑制与PDTC的剂量呈量-效依赖关系。PDTC 50 mg/kg时,NF- κ B活性有所抑制(与单独细菌组比较 $P < 0.01$);PDTC 100 mg/kg时,NF- κ B的活性低于PDTC 50 mg/kg组 ($P < 0.01$);而应用PDTC 200 mg/kg,NF- κ B活性受抑最明显(与PDTC 100 mg/kg组比较 $P < 0.05$)。见图3,4。

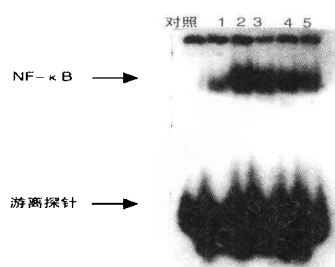


图3 注菌后3 h各组 NF- κ B 活性

Figure 3 Activity of NF- κ B in each group 3 hours after injection of staphylococcus aureus

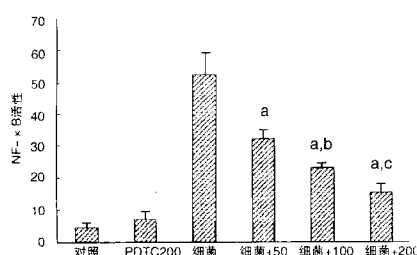


图4 注菌后3 h各组 NF- κ B 活性扫描结果

注: a 与单独细菌组比较 $P < 0.01$; b 与细菌 + PDTC 50 mg/kg 比较 $P < 0.01$; c 与细菌 + PDTC 100 mg/kg 比较 $P < 0.05$

Figure 4 Scan results of the activity of NF- κ B in each group 3 hours after injection of staphylococcus aureus

Note: a vs the bacterial model group $P < 0.01$; b vs the PDTC 50 mg group $P < 0.01$; c vs the PDTC 100 mg group $P < 0.05$

3 讨论

目前大量文献报道,新生儿败血症患儿血浆TNF- α , IL-6, IL-1 β 和 IL-8等均明显升高^[1,2]。而已有研究证实这些免疫因子以及粘附分子等多种炎症介质的启动子和增强子中存在 κ B序列,活化的NF- κ B可单独与其他转录因子协同,参与这些介质基因的诱导表达。NF- κ B作为一特殊序列的转录因子,它调控的基因涵盖细胞因子、趋化因子、粘附

分子、急性期反应蛋白、II型环氧化酶、磷脂酶A2、转录因子等。参与多种生理或病理过程如:炎症和免疫反应、急性期反应、细胞凋亡、细胞周期控制与分化以及对病毒感染的反应等^[4]。提示NF- κ B可能在新儿败血症发病机制中起着重要作用。

有文献报道,内毒素(LPS)腹腔注射可引起鼠肺泡巨噬细胞和肺组织NF- κ B的激活^[5]。Browder在成年鼠阑尾结扎穿孔(CLP)致多细菌性败血症肺脏NF- κ B活性的检测实验中有类似发现^[6]。我们在实验中发现,在新生鼠败血症模型中,肺脏NF- κ B活性在应用金黄色葡萄球菌后1 h即有增强,3 h达高峰,以后逐渐减弱,24 h已未见有明显的NF- κ B的活化。提示金黄色葡萄球菌败血症新生鼠肺脏在受到刺激后NF- κ B活性增强。从实验中我们还可以发现,NF- κ B在金黄色葡萄球菌新生鼠败血症早期发挥作用,而在败血症后期,可能是其产生的一系列细胞因子、化学因子发挥作用。Willim也在研究中发现,CLP鼠肺IL-1 β , IL-1R α , TNF- α , IL-6, INF- γ , IL-2, IL-10, G-CSF等均明显增加,大量细胞因子表达的增强发生在NF- κ B活性增强之后,提示NF- κ B活性的增强调节细胞因子网络,促使大量细胞因子产生^[6]。而对于新生鼠金黄色葡萄球菌败血症NF- κ B活性变化的相关报道目前尚未见。

正常情况下,NF- κ B与抑制性分子I κ B结合以无活性的三聚体形式存在于细胞浆中,当细胞受到刺激时,I κ B发生降解,NF- κ B二聚体则向胞核转移,与DNA链中特定序列结合启动基因转录^[7]。而I κ B的激活主要通过其激酶I κ B激酶(IKK)的激活。在此前的研究中已经证实IKK对于活性氧中间产物(ROIs)非常敏感,ROIs是诱导NF- κ B活化过程中一个很重要的因素^[8,9]。机体在受到紫外线、微生物、环境毒物等刺激产生活性氧中间产物后,可激活IKK,继而激活I κ B的降解,NF- κ B复合物游离进入细胞核内而活化^[7]。而此前已有研究证实抗氧化剂PDTC既能直接清除ROIs又有金属离子螯合作用,对于LPS诱导的NF- κ B激活有明显的抑制作用^[8]。所以,我们将抗氧化剂PDTC应用于新生鼠金黄色葡萄球菌性败血症中,观察其对NF- κ B活化的影响。

我们在实验中发现,金黄色葡萄球菌败血症新生鼠中,肺脏NF- κ B活性在应用PDTC后均受到抑制,而且随着剂量的增加抑制作用增强,存在量-效关系。应用PDTC 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg预处理,注菌3 h后肺脏NF- κ B活性均低于未应用PDTC组,且随PDTC剂量增大,NF- κ B活性抑

制作用增强。而单独应用 PDTC 200 mg/kg 组(未受到金黄色葡萄球菌刺激),NF- κ B 活性与正常对照组比较差异无显著性。因此 PDTC 可能在抑制 NF- κ B 活性,进而减少相应的对机体造成损害的细胞因子的产生中发挥一定作用。Liu 等在研究中也发现,应用 PDTC 可抑制 LPS 诱导的肺脏 NF- κ B 激活,而且随着剂量的增加,抑制作用增强。同时他们还发现,在应用 PDTC 的大鼠中,肺脏 TNF- α 等细胞因子诱导的中性粒细胞趋化因子(CINC)、ICAM-1、环氧化酶 2(COX-2)的浓度与未应用组比较均有明显减少。他们还发现 PDTC 能减少 LPS 诱导的多个器官组织中性粒细胞堆积,阻止 LPS 诱导的多个器官微血管内皮通透性的增加^[10]。因此我们认为,应用抗氧化剂尽早清除机体内 ROIs 可能是减少新生儿金黄色葡萄球菌败血症危害性的一种较为有效的方法,PDTC 在新生儿败血症治疗中的作用尚需要进一步进行探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Dollner H, Vatten L, Linnebo I, Zanussi GF, Laerdal A, Austgulen R. Inflammatory mediators in umbilical plasma from neonates who develop early-onset sepsis [J]. *Biol Neonate*, 2001, 80(1): 41-47.
- [2] Silveira RC, Procianny RS. Evaluation of interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for early diagnosis of neonatal sepsis [J]. *Acta Paediatr*, 1999, 88(6): 647-650.
- [3] Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B [J]. *Annu Rev Cell Biol*, 1994, 10: 405-455.
- [4] Patrick A, Baltimore B, Baltimore D. NF-kB: Ten years after [J]. *Cell*, 1996, 87(1): 13.
- [5] Blackwell TS, Blackwell TR, Holden EP, Christman BW, Christman JW. In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation [J]. *J Immunol*, 1996, 157(4): 1630-1637.
- [6] Browder W, Ha T, Chuanfu L, Kalbfleisch JH, Ferguson DA, Williams DL. Early activation of pulmonary nuclear factor κ B and nuclear factor interleukin-6 in polymicrobial sepsis [J]. *J Trauma*, 1999, 46(4): 590-596.
- [7] Lee JI, Burckart GJ. Nuclear factor kappaB: Important transcription factor and therapeutic target [J]. *J Clin Pharmacol*, 1998, 38(11): 981-993.
- [8] Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor- κ B activation [J]. *Biochemical pharmacology*, 2000, 59(1): 13-24.
- [9] Suzuki Y, Mizuno J M. Signal transduction for nuclear factor- κ B activation: proposed location of antioxidant-inhibitable step [J]. *J Immunol*, 1994, 153(11): 5008.
- [10] Liu SF, Ye X, Malik AB. Inhibition of NF- κ B activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents in vivo expression of proinflammatory genes [J]. *Circulation*, 1999, 100(12): 1330-1337.

(本文编辑:俞燕)

· 消息 ·

《儿科药理学杂志》2004 年征稿征订启事

《儿科药理学杂志》是由中国药学会儿科药理学专业组和重庆医科大学儿童医院(儿科学院)联合主办,国内外公开发行人,目前国内儿科药理学领域唯一的专业性科技期刊。创刊后发展很快,深受各方厚爱,是《中国医学文摘·儿科学》引用的核心期刊,为《中文科技期刊数据库》、《中文生物医学期刊文献库(CMCC)》全文刊载,加入了《中国学术期刊(光盘版)》和《中国期刊网》、《万方数据-数字化期刊群》,是《中国学术期刊综合评价数据库来源期刊》和《CAJ-CD》执行优秀标准期刊。

本刊内容包括儿科药理学、儿科中西医制剂、儿科临床用药、药物分析、临床药理学、药事管理、新药评价、药理学基础知识与理论、最新研究成果、先进技术介绍等。辟有论著与述评、实验研究、科技交流、临床药理学、药物与临床、综述、药理管理与改革、经验介绍、围生期用药、安全用药与不良反应、医药新产品、读者园地、文摘、国内外学术信息报道等栏目。集科学性、学术性、知识性与实用性为一体,重在实用,兼顾提高,以儿科药理学、儿科医学、医药院校师生及其他各级各类医药卫生工作者为主要读者对象。

本刊为双月刊,大 16 开本,64 页,每期定价 5.50 元,全年 33.00 元,双月 10 日出刊。中国标准刊号:ISSN 1672-108X, CN 50-1156/R。邮发代号:国内 78-133,国外 1494Q。欢迎广大读者到当地邮局订阅,并可随时向本刊编辑部邮购,免邮寄费。海外读者向中国国际图书贸易公司(北京 399 信箱,邮编 100044)订阅。

《儿科药理学杂志》编辑部地址:重庆市渝中区中山二路 136 号,重庆医科大学儿童医院内,邮编:400014。电话:023-63632756-3412、023-63626877,传真:023-63626877, E-mail:ekyx61@cta.cq.cn。