

· 论著 ·

纳洛酮与甲基泼尼松龙联用对急性肺损伤大鼠肺组织核转录因子- κ B 表达的影响

张秋金 沈洪 张维 李银平· 黎檀实

【摘要】 目的 探讨联合应用甲基泼尼松龙和纳洛酮对内毒素(LPS)所致急性肺损伤(ALI)大鼠肺组织核转录因子- κ B(NF- κ B)表达的作用。**方法** 建立大鼠LPS吸入性ALI模型(LPS 3 mg/kg 气管内注射)。85 只大鼠随机分为 5 组:生理盐水对照组, LPS 损伤组, 甲基泼尼松龙组(LPS+甲基泼尼松龙), 纳洛酮组(LPS+纳洛酮), 联合用药组(LPS+甲基泼尼松龙+纳洛酮)。采用放射免疫法检测大鼠血清白细胞介素-8(IL-8)水平, 并应用免疫组化法观察肺组织NF- κ B p65 蛋白表达的变化。**结果** 经气道吸入LPS可致大鼠发生ALI。ALI大鼠肺组织NF- κ B p65 蛋白表达明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), IL-8 水平亦明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 单用甲基泼尼松龙或纳洛酮组肺组织NF- κ B p65 蛋白表达率及IL-8水平均较LPS损伤组明显降低, 以联合用药组更为明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 联合应用甲基泼尼松龙和纳洛酮可降低LPS吸入性ALI大鼠血清IL-8升高, 并显著抑制肺组织NF- κ B p65 蛋白表达。

【关键词】 肺损伤, 急性; 白细胞介素-8; 核转录因子- κ B; p65 蛋白; 纳洛酮; 甲基泼尼松龙

Effects of combined naloxone and methylprednisolone on nuclear factor - κ B expression in the lung in acute lung injury in rats ZHANG Qiu-jin*, SHEN Hong, ZHANG Wei, LI Yin-ping, LI Tan-shi.
*Emergency Department, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of a combination of naloxone and methylprednisolone on nuclear factor - κ B (NF- κ B) p65 expression in the lung tissue in lipopolysaccharide (LPS) -induced acute lung injury (ALI) in rats. **Methods** ALI models were reproduced by intratracheal instillation of LPS (3 mg/kg). Four hours after LPS instillation, rats were randomly divided into five groups; normal saline group, LPS group, methylprednisolone group, naloxone group (LPS+naloxone) and combined drug group (LPS+naloxone+ methylprednisolone). The level of interleukin -8 (IL -8) in serum was measured by immunoassay. Meanwhile, the expression of NF - κ B p65 in the lung tissue was determined with immunohistochemical staining. **Results** Naloxone and methylprednisolone significantly reduced the LPS -induced increase in IL -8 concentrations in serum in vivo, and suppressed the activation of NF - κ B p65 in the lung tissue. **Conclusion** NF - κ B activation is involved in the LPS -induced ALI in rats. Combination of naloxone and methylprednisolone could suppress the increase of IL -8 content and NF - κ B activation in the lung tissue of rat in vivo in our experiment.

【Key words】 acute lung injury; interleukin -8; nuclear factor - κ B; p65; naloxone; methylprednisolone

目前认为,急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是由多种炎性介质、效应细胞共同参与,并呈级联放大的瀑布样炎症继发性损伤。已知,ALI为多器官功能障碍综合征(MODS)在肺内的具体表现,在MODS发生、发展过程中,ALI出现得最早,且发生率最高,并贯穿于MODS的全过程。因此,积极治疗ALI对于防治MODS的发生、发展具有决定性意义^[1]。在各种原因所致ALI过程中,核转录因子- κ B(NF- κ B)活性增强,其表达的炎症细胞因子如肿瘤

坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6和IL-8等大量增加,使炎症反应不断放大,肺损伤加重。应用NF- κ B抑制剂后,NF- κ B活性降低,炎症细胞因子表达减少,组织损伤减轻^[2]。本实验拟通过气管内注射内毒素(LPS)建立吸入性大鼠ALI模型,观察联用纳洛酮和甲基泼尼松龙对LPS所致ALI大鼠血清IL-8水平及肺组织NF- κ B活化的影响,了解NF- κ B活化在ALI中的作用机制,探讨临床应用纳洛酮和甲基泼尼松龙治疗ALI的价值。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂:雄性Wistar大鼠,体重(250±50)g,由中国实验动物中心提供。LPS(O55:B5)由Sigma公司提供,购自北京鼎国公司。IL-8试剂盒

基金项目:解放军总后“十五”指令性课题(04LX043)

作者单位:100853 北京,解放军总医院急诊科(张秋金,沈洪,张维,黎檀实);天津市天和医院(李银平)

通讯作者:黎檀实,医学博士,教授,硕士研究生导师,主任医师

作者简介:张秋金(1972-),男(汉族),河北省石家庄市人,硕士研究生,主治医师。

由北京东亚免疫技术研究所提供。NF-κB p65 抗体及免疫组化染色试剂盒均购自武汉博士德公司。

1.2 动物模型制备: LPS 吸入性大鼠 ALI 模型按照文献[3]介绍的方法加以改良。向大鼠腹腔内注射氯胺酮(30 mg/kg)麻醉,取仰卧位,沿颈部中线依次切开皮肤、皮下组织,暴露环甲膜,稳定 15 min。头部垫高呈 60°,先取左侧卧位,用 8 号针头刺入气管内一次性注入 LPS 0.1 ml,并注入空气 0.2 ml;30 s 后改为右侧卧位,再以同样的方法注入 LPS 0.2 ml,并注入空气 0.5 ml;30 s 后改为平卧位,LPS 总量为 3 mg/kg。4 h 后观察模型大鼠的表现,评价 ALI 模型是否成功。生理盐水对照组暴露气管后按上述方法向气管内注入等量生理盐水及空气,余操作同模型组。

1.3 动物分组: 85 只大鼠按随机数字表法随机分为 5 组:①生理盐水对照组(n=5):生理盐水 0.5 ml/kg 腹腔内注射,每 12 h 1 次;②LPS 损伤组(n=20):制模后 4 h 予生理盐水 0.5 ml/kg 腹腔内注射,每 12 h 1 次;③甲基泼尼松龙组(n=20):制模后 4 h 予甲基泼尼松龙 30 mg/kg 腹腔内注射,每 12 h 1 次;④纳洛酮组(n=20):制模后 4 h 予纳洛酮 1 mg/kg 腹腔内注射,每 12 h 1 次;⑤联合用药组(n=20):制模后 4 h 予纳洛酮 2 mg/kg+甲基泼尼松龙 20 mg/kg 腹腔内注射,每 12 h 1 次。

1.4 标本采集及指标检测: 所有动物均于制模后 12、24、48 和 72 h 腹腔内注射氯胺酮(30 mg/kg)麻醉行如下检测。

1.4.1 取颈内动脉血 1.5 ml 进行血气分析。

1.4.2 血清 IL-8 含量测定: 放血活杀,血液离心后收集上清液,-80 °C 冻存。采用放射免疫检测法,按试剂盒说明书要求操作。

1.4.3 免疫组化检测: 取右上肺,以体积分数为 10%的甲醛溶液固定,石蜡包埋,连续切片,苏木素-伊红(HE)染色,按下列步骤操作。①切片常规脱蜡至水;②体积分数为 3%的 H₂O₂ 室温 10 min 以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水洗 3 次;③滴加复合消化液 10 min,蒸馏水洗 3 次;④滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 min,甩去多余液体,不洗;⑤滴加一抗 NF-κB p65 兔抗大鼠多克隆抗体,1:100,37 °C 1 h,0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)洗 2 min×3 次;⑥滴加生物素化山羊抗兔二抗 IgG,37 °C 15 min,PBS 洗 2 min×3 次;⑦滴加试剂链霉亲和素-过氧化物酶复合物(SABC)15 min,PBS 洗 5 min×4 次;⑧3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色:使

用 DAB 显色试剂盒,取 1 ml 蒸馏水,加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀后加至切片,室温显色,镜下控制反应时间,蒸馏水洗涤;⑨苏木素轻度复染,脱水,透明,封片。同一切片于高倍镜(×400)下计算 5 个不同视野,每个视野数 100 个细胞,记录阳性细胞数量,取平均值计算阳性比例。

1.5 统计学分析: 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 Stata7.0 统计软件进行数据处理,行方差分析及组间比较,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 IL-8 含量的变化(表 1): LPS 致伤后,大鼠血清 IL-8 含量明显升高,24 h 达峰值,以后逐渐下降。与生理盐水对照组比较,LPS 损伤组及用药各组血清 IL-8 含量均明显升高(P<0.05 或 P<0.01),与 LPS 损伤组比较,联合用药组血清 IL-8 含量于制模后 12 h 和 24 h 明显降低(P 均<0.05)。

表 1 各组大鼠血清 IL-8 含量变化($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Changes of IL-8 contents of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=5$) $\mu\text{g/L}$

组别	制模后 12 h	制模后 24 h	制模后 48 h	制模后 72 h
LPS 损伤组	0.47±0.08*	0.48±0.09*	0.40±0.06*	0.35±0.05*
甲基泼尼松龙组	0.35±0.07*	0.34±0.06*	0.34±0.07	0.31±0.06
纳洛酮组	0.34±0.05*	0.35±0.06*	0.36±0.09*	0.32±0.08
联合用药组	0.33±0.06*△	0.33±0.08△	0.29±0.06	0.26±0.07

注:与生理盐水对照组[(0.20±0.06)μg/L]比较;*P<0.05, *P<0.01;与同时间点 LPS 损伤组比较;△P<0.05

2.2 各组大鼠肺组织 NF-κB 表达(表 2,彩色插页图 1~5): 与生理盐水对照组比较,LPS 损伤组、甲基泼尼松龙组、纳洛酮组和联合用药组各时间点肺组织 NF-κB p65 阳性细胞表达率均显著增高(P<0.05 或 P<0.01);与 LPS 损伤组比较,甲基泼尼松龙组、纳洛酮组和联合用药组肺组织 NF-κB p65 阳性细胞表达率有不同程度降低,制模后 12、24 和 48 h 差异均有显著性(P<0.05 或 P<0.01),72 h 仅联合用药组差异有显著性(P<0.05)。

表 2 各组大鼠肺组织 NF-κB 阳性细胞表达率($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Positive expression rate of NF-κB in rats' lung tissue in each group($\bar{x} \pm s, n=5$) %

组别	制模后 12 h	制模后 24 h	制模后 48 h	制模后 72 h
LPS 损伤组	36.00±4.89*	42.27±2.57*	34.92±4.29*	28.61±6.76*
甲基泼尼松龙组	25.94±3.59*▲#	28.82±3.91*▲#	27.12±3.98*△○	21.00±5.79*
纳洛酮组	27.52±2.95*▲○	30.15±6.51*▲○	27.28±3.04*△○	21.53±4.72*
联合用药组	18.54±2.71*▲	20.62±2.63*▲	18.55±2.70*▲	17.55±4.75*△

注:与生理盐水对照组[(6.72±1.65)%]比较;*P<0.05, *P<0.01;与同时间点 LPS 损伤组比较;△P<0.05, ▲P<0.01;与同时间点联合用药组比较;#P<0.05, ○P<0.01

3 讨论

已明确 NF- κ B 属 Rel 蛋白家族,包括 NF- κ B1 (p50 及前体 p105)、NF- κ B2 (p52 及前体 p100)、c-Rel、RelA (p65) 和 RelB。NF- κ B 由两个属于 Rel 家族的亚单位组成,以同二聚体或异二聚体形式存在。p65 和 p50 的异二聚体是最早被鉴定,在绝大多数细胞中含量最丰富,在静息细胞中,NF- κ B 二聚体与 NF- κ B 抑制蛋白(I κ B)结合,阻止其向细胞核中转移。当各种刺激因素激活靶细胞,使 I κ B 磷酸化、泛素化,导致蛋白水解性降解,使 NF- κ B 游离并转位到核中与靶基因启动子序列上相同的 κ B 位点结合,从而激活转录,引起一系列炎性因子的表达^[4,5]。郭振辉等^[6]发现炎性细胞受不同刺激因子的作用,可致 NF- κ B 活化而发生核移位,进而启动一系列参与炎症反应的炎症分子表达,参与大鼠 ALI 的炎症反应和损伤过程。

IL-8 被认为是急性呼吸窘迫综合征(ARDS) 时多形核白细胞 (polymorphonuclear leukocyte, PMN) 趋化与激活的重要细胞因子之一,可由单核/巨噬细胞、PMN、内皮细胞等在受到刺激时产生。在脓毒症休克时,特别是脓毒症 ARDS 中,血浆 IL-8 浓度明显增高,且与 PMN 弹性蛋白酶浓度变化呈明显相关性^[7]。

研究发现,调节免疫系统和炎症基因的 NF- κ B 可能是激素介导引起机体免疫抑制作用的靶点,应用合成地塞米松可诱导 I κ B 基因转录,从而增加 I κ B- α 蛋白合成,抑制 NF- κ B 向核内的移位,减少细胞因子合成,阻断机体免疫系统的激活^[8]。由于糖皮质激素对于机体免疫系统的广谱效应,使得激素的应用存在很大争议。一些研究认为,对早期脓毒症及 ARDS,短程(≤ 48 h)、大剂量甲基泼尼松龙无明显疗效。但 Meduri 等^[9]发现,长时间应用甲基泼尼松龙可显著改善难治性 ARDS 患者的肺功能,而且与其存活率与肺功能改善相关,认为需要重新评价甲基泼尼松龙在 ARDS 治疗中的作用。

研究表明,应用小剂量吗啡(1×10^{-9} mol)引起巨噬细胞 NF- κ B 的激活,这一效应能被阿片受体拮抗剂纳洛酮所阻断^[10]。亦有研究认为,吗啡抑制 LPS 所致人血中性粒细胞及单核细胞 NF- κ B 激活,而与其浓度无关^[11]。在肺损伤复杂的发病机制中,激活的补体、血小板和白细胞滞留起重要作用,而滞留白细胞释放的有害细胞因子如血栓素 A₂ (TXA₂) 和自由基更是重要的致伤因素。纳洛酮可逆转 LPS 休克的低血压状态,增加平均动脉压及冠

状动脉等内脏器官的血流量,提高动脉血气水平,所以纳洛酮能改善休克所致的器官血流动力学障碍,从而改善休克状态。此外,纳洛酮可抑制氧自由基、溶酶体酶的释放,保护溶酶体膜,抑制花生四烯酸代谢,减少 PMN 释放超氧自由基阴离子^[12,13]。

本研究结果显示,甲基泼尼松龙和纳洛酮都能明显抑制肺组织间质细胞和上皮细胞 NF- κ B 活化,联合应用的效果较单用纳洛酮和甲基泼尼松龙对肺上皮细胞 NF- κ B 活化的抑制作用更强,且能减少甲基泼尼松龙的用量。提示使用纳洛酮和甲基泼尼松龙抗 LPS 所致大鼠 ALI 的作用机制有可能是通过阻断 NF- κ B 的激活来缓解炎症反应;联合用药有协同的保护作用。

参考文献:

- 李志军,李银平,王今达. 肺与大肠相表里学说与多器官功能障碍综合征[J]. 中国中西医结合急救杂志,2004,11:131-132.
- 毛宝龄,钱桂生,陈正堂,主编. 急性呼吸窘迫综合征[M]. 北京:人民卫生出版社,2002. 85-90.
- Iwamura H, Inushima K, Taheuchi K, et al. Prophylactic effect of JTE-607 on LPS-induced acute lung injury in rats with CINC-1 inhibition[J]. Inflamm Res, 2002, 51:160-166.
- Blackwell T S, Christman J W. The role of nuclear factor - kappa B in cytokine gene regulation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17:3-9.
- Abraham E. Neutrophils and acute lung injury[J]. Crit Care Med, 2003, 31:S195-S199.
- 郭振辉,洪新,毛宝龄,等. 核因子- κ B 活化在脓毒症急性肺损伤发病中的作用[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12:334-337.
- Endo S, Inada K, Ceska M, et al. Plasma interleukin 8 and polymorphonuclear leukocyte elastase concentrations in patients with septic shock[J]. J Inflamm, 1995, 45:136-142.
- Scheinman R I, Cogswell P C, Lofquist A K, et al. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids [J]. Science, 1995, 270: 283-286.
- Meduri G U, Headley A S, Golden E, et al. Effect of prolonged methylprednisolone therapy in unresolving acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial [J]. JAMA, 1998, 280:159-165.
- Roy S, Cain K J, Chapin R B, et al. Morphine modulates NF-kappaB activation in macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 245:392-396.
- Welters I D, Menzebach A, Goumon Y, et al. Morphine inhibits NF-kappaB nuclear binding in human neutrophils and monocytes by a nitric oxide-dependent mechanism [J]. Anesthesiology, 2000, 92:1677-1684.
- Simpkins C O, Ives N, Tate E, et al. Naloxone inhibits superoxide release from human neutrophils [J]. Life Sciences, 1985, 37: 1381-1386.
- 孟庆林. 纳洛酮在危重病中的应用[J]. 中国急救医学, 2001, 21: 119-120.

(收稿日期:2005-04-06 修回日期:2005-06-01)

(本文编辑:郭方)

急性肺血栓栓塞症血尿酸增高的意义 (正文见342页)

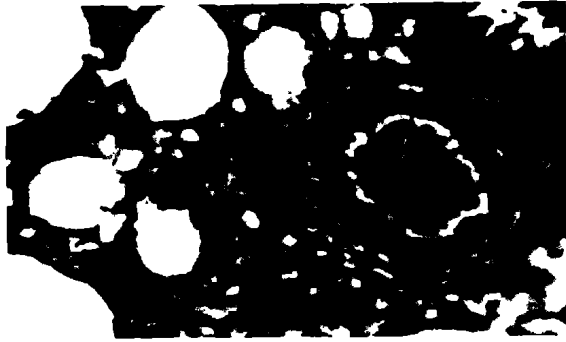


图2 PTE后第1 d,肺泡水肿、出血,肺泡间隔增厚,其内大量炎性细胞浸润 (HE,×100)
Figure 2 1 day after PTE with local hemorrhages in alveoli and inflammatory cell infiltration in interstitial tissue (HE, × 100)



图3 PTE后第14 d,肺泡结构基本正常,间质内仍有炎性细胞 (HE, ×100)
Figure 3 14 days after PTE with inflammatory cell infiltration in interstitial tissue (HE, ×100)

沐舒坦对吸入性肺损伤大鼠的肺保护作用 (正文见364页)

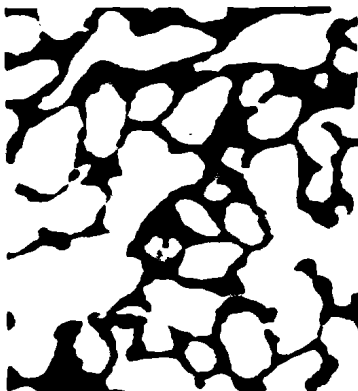


图1 A组肺组织病理变化 (HE, ×100)
Figure 1 Pathologic changes of lung tissue in group A(HE, ×100)

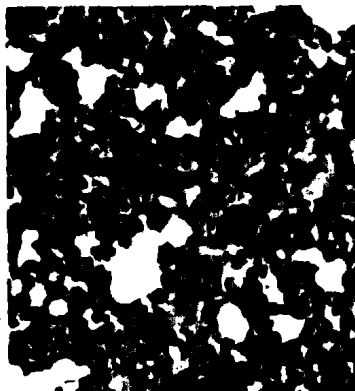


图2 B组肺组织病理变化 (HE, ×100)
Figure 2 Pathologic changes of lung tissue in group B(HE, ×100)

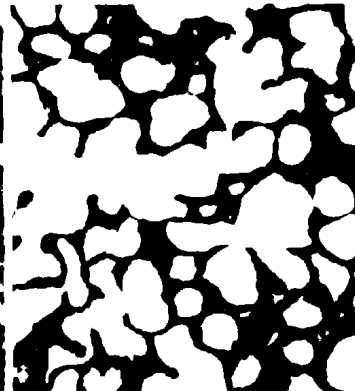


图3 C组肺组织轻度病理变化 (HE, ×100)
Figure 3 Mild pathologic changes of lung tissue in group C(HE, ×100)



图4 C组肺组织重度病理变化 (HE, ×100)
Figure 4 Severe pathologic changes of lung tissue in group C(HE, ×100)

纳洛酮与甲基泼尼松龙联用对急性肺损伤大鼠肺组织核转录因子-κB表达的影响 (正文见370页)



图1 生理盐水对照组肺组织NF-κB表达 (SABC, ×400)
Figure 1 NF-κB expression in lung tissue in normal saline control group(SABC, × 400)



图2 LPS损伤组肺组织NF-κB表达 (SABC, ×400)
Figure 2 NF-κB expression in lung tissue in LPS injury group(SABC, × 400)



图3 甲基泼尼松龙组肺组织NF-κB表达 (SABC, ×400)
Figure 3 NF-κB expression in lung tissue in methylprednisolone group(SABC, × 400)

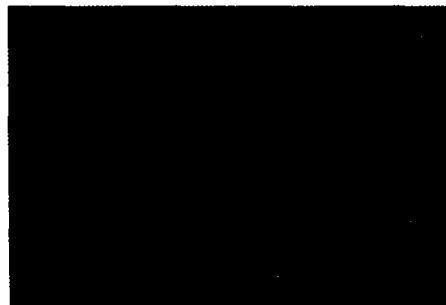


图4 纳洛酮组肺组织NF-κB表达 (SABC, ×400)
Figure 4 NF-κB expression in lung tissue in naloxone group(SABC, × 400)

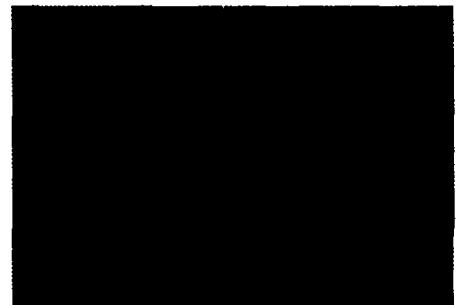


图5 联合用药组肺组织NF-κB表达 (SABC, ×400)
Figure 5 NF-κB expression in combined drug group(SABC, × 400)