

· 论著 ·

烫伤脓毒症大鼠肾脏核转录因子- κ B 活化与肾损伤关系的研究

姚风华 姚小弟 李冀军 柴家科

【摘要】目的 研究烫伤脓毒症大鼠肾脏核转录因子- κ B (NF- κ B)活化与肾损伤的关系。**方法** 采用 30% 总体表面积Ⅲ度烫伤加内毒素攻击制备烫伤脓毒症大鼠模型。54 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、烫伤脓毒症 1、2、6、12 和 24 h 组,烫伤脓毒症 1、2 和 6 h+NF- κ B 抑制剂吡咯烷二硫基甲酸酯(PDTC)组。采用凝胶电泳迁移率改变分析法(EMSA)检测肾组织 NF- κ B 活性;采用酶联免疫吸附法检测血浆及肾组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量的变化;采用自动生化分析仪检测血肌酐(SCr)和尿素氮(BUN)含量。**结果** 肾组织 NF- κ B 活性于烫伤脓毒症后 1 h 明显增强并达到高峰($P < 0.01$),PDTC 可显著降低烫伤脓毒症后 1 h NF- κ B 的活性。烫伤脓毒症后 1 h 和 2 h 血浆及肾组织中 TNF- α 水平均明显增高(P 均 < 0.01),PDTC 可显著降低伤后血浆 TNF- α 水平(P 均 < 0.01),对肾组织中 TNF- α 水平影响不明显。烫伤脓毒症后 BUN 及 SCr 含量均明显增高(P 均 < 0.01),PDTC 对 BUN 和 SCr 含量均无显著影响。**结论** NF- κ B 抑制剂可降低烫伤脓毒症大鼠肾组织 NF- κ B 活性,但对肾脏功能无明显保护作用。

【关键词】 脓毒症; 烫伤; 核转录因子- κ B; 肿瘤坏死因子- α ; 肾损伤

Relationship between nuclear factor - κ B activity and kidney injury in rats with postburn sepsis YAO Feng-hua*, YAO Xiao-di, LI Ji-jun, CHAI Jia-ke. * Department of Nephrology, 304 th Hospital Affiliated to General Hospital of PLA, Beijing 100037, China

【Abstract】Objective To investigate the relationship between nuclear factor - κ B (NF- κ B) activity and kidney injury in rats with postburn sepsis. **Methods** Rats subjected to 30% full-thickness scald injury, followed by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide(LPS), were used in the present study. Fifty-four Wistar rats were randomly divided into normal control group, postburn sepsis 1, 2, 6, 12, 24 hours groups, and sepsis with NF- κ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) treatment 1, 2, and 6 hour groups. NF- κ B activity, tumor necrosis factor - α (TNF- α) protein expression, and renal function were determined with electrophoretic mobility shift assay (EMSA), enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA), and automatic biochemistry analyzer, respectively. **Results** NF- κ B activity in kidney was markedly enhanced and reached its peak 1 hour after scalding and injection of LPS (all $P < 0.01$), and was decreased remarkably after the administration of PDTC. PDTC could suppress the elevated plasma TNF- α protein expression (both $P < 0.01$), but not renal TNF- α levels. PDTC could not reduce blood urea nitrogen and blood creatinine contents, which were increased after scalding followed by LPS challenge. **Conclusion** The results suggest that the treatment with NF- κ B inhibitor PDTC could down-regulate the NF- κ B activity in kidney, but it could not protect the renal function in rats with postburn sepsis.

【Key words】 sepsis; postburn nuclear factor - κ B; tumor necrosis factor - α ; kidney injury

脓毒症是指由感染引起的全身炎症反应综合征(SIRS),目前认为其发生的根本原因是机体过度释放细胞因子和炎性介质,导致炎症反应失控和免疫功能紊乱,进一步可发展为多器官功能障碍综合征(MODS)^[1,2]。肾脏是大面积烧伤及脓毒症早期最易受损的器官之一^[3]。核转录因子- κ B(NF- κ B)调控许多与免疫有关基因[如白细胞介素-1(IL-1)、

IL-2、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)]的表达^[4],与脓毒症的发生有密切关系。但其在脓毒症引起肾损伤中的作用及机制目前还知之甚少。本研究中以烫伤合并内毒素攻击大鼠为模型,模拟临床烧伤脓毒症,观察 NF- κ B 抑制剂对脓毒症时肾脏 NF- κ B 活性、TNF- α 表达及肾功能的影响,初步探讨其在烫伤脓毒症时肾损伤中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与器材:脂多糖(LPS, E. coli O55:B5, Sigma 公司),吡咯烷二硫基甲酸酯(PDTC, Sigma 公司), ALLN (N-acetyl-leucynyl-leucynyl-norleucinal, Calbiochem 公司), T4 多聚核苷酸激酶(Promega 公司), Poly(dI-dC) (Roche 公司),

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(2005CB522602, G1999054203-2);首都医学发展科研基金重点项目(2003-2023)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第三〇四临床部肾内科(姚风华,李冀军),烧伤研究所(柴家科);100852 北京,总参军训和兵种部北京第三干休所(姚小弟)

作者简介:姚风华(1979-),女(汉族),湖北省人,医师。

酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(Diaclone 公司), NF- κ B寡核苷酸探针(奥科公司),血肌酐(SCr)生化试剂(Promega 公司),血尿素氮(BUN)生化试剂(利德曼公司)。垂直电泳槽、电泳仪(北京六一厂),高速低温台式离心机(Beckman 公司),高速匀浆机(Heidolph 公司),7170 型自动生化分析仪(Hitachi 公司)。

1.2 动物模型建立及分组:雄性 Wistar 大鼠(军事医学科学院动物中心提供),在本单位室温为 22~25 °C 的动物实验室饲养 1 周以上,然后制备烫伤脓毒症动物模型。实验前 12 h 禁食,自由饮水,戊巴比妥钠(45 mg/kg)腹腔注射麻醉,背部去毛,沸水(100 °C、12 s)造成大鼠背部 30%总体表面积 III 度烫伤。伤后立即腹腔注射 LPS 4 mg/kg 以模拟烫伤脓毒症,生理盐水 100 ml/kg 背部皮下注射,抗休克、单笼饲养。54 只大鼠随机分为 3 组:正常对照组(6 只),麻醉后活杀;烫伤脓毒症组,分别于伤后 1、2、6、12 和 24 h 活杀(各 6 只);烫伤脓毒症+PDTC 组,于伤前 1 h 腹腔注射 PDTC 200 mg/kg,分别于伤后 1、2 和 6 h 活杀(各 6 只)。于实验各时间点麻醉状态下取腹主动脉血,置抗凝玻璃试管中,离心(3 000×g, 15 min)分离血浆,-20 °C 保存待测。取血后切下并剪碎双肾,置消毒的冻存管中,液氮保存。

1.3 指标检测

1.3.1 NF- κ B 活性测定:采用凝胶电泳迁移率改变分析法(EMSA)。

1.3.1.1 核蛋白提取:参照 Deryckere 等^[5]的方法提取。

1.3.1.2 探针序列及其标记:①探针序列:P1:5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3';P2:5'-GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T-3'。②探针标记参照王勇等^[6]的方法。

1.3.1.3 乙醇沉淀法纯化探针:参照《分子克隆实验指南》^[7]中的方法。

1.3.1.4 探针与核蛋白的结合及电泳:在小离心管(EP 管)中依次加入双蒸水,5×蛋白结合反应缓冲液 4 μ l, Poly(dI-dC) 2 μ l 和核蛋白 3 μ g, 最终为 20 μ l 反应体系,混匀,25 °C 预保温 10 min。之后加入 1 μ l 标记 DNA 探针,混匀,25 °C 预保温 20 min,加入 4 μ l 上样缓冲液,混匀,上样,质量分数为 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(12 V/cm)1~2 h,电泳缓冲液为 0.5×磷酸盐(TBE),将凝胶转移到新华一号滤纸上,保鲜膜密封,-70 °C 放射自显影 24 h。电泳滞后带用凝胶图像分析系统进行分析,结果以

吸光度值(A 值)×面积表示。

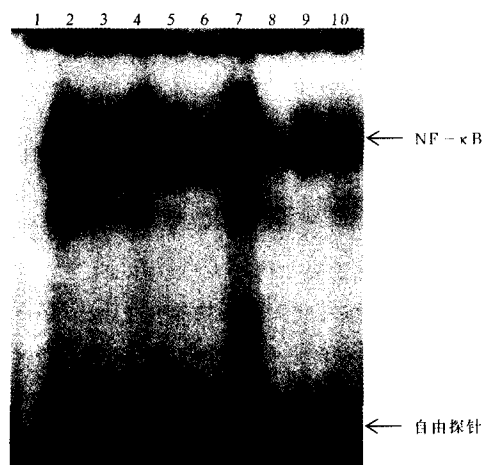
1.3.2 TNF- α 检测:按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.3.3 SCr 和 BUN 检测:采用自动生化分析仪进行。

1.4 统计学方法:数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,Stata4.0 统计软件包进行处理,采用 t 检验、方差分析等,P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 烫伤脓毒症大鼠肾组织 NF- κ B 活性变化及其 PDTC 对它的影响(图 1,表 1):肾组织 NF- κ B 活性于烫伤脓毒症后 1 h 显著增强并达到高峰(P 均<0.01),烫伤脓毒症后 2 h 其活性有所下降,而于烫伤脓毒症后 6 h 又有较明显的增强,之后均呈下降趋势。PDTC 可显著降低烫伤脓毒症后 1 h NF- κ B 的活性,但不能显著降低烫伤脓毒症后 2 h NF- κ B 的活性。



1:正常对照组;2~6:烫伤脓毒症 1、2、6、12 和 24 h 组; 7:烫伤脓毒症 1 h 组;8:烫伤脓毒症 1 h+PDTC 组; 9:烫伤脓毒症 2 h 组;10:烫伤脓毒症 2 h+PDTC 组

图 1 烫伤脓毒症大鼠肾组织 NF- κ B 活性变化及其 PDTC 对它的影响

Figure 1 Changes of NF- κ B activity in renal tissue in rats with postburn sepsis and effect of PDTC on NF- κ B activity

表 1 烫伤脓毒症大鼠肾组织 NF- κ B 活性变化($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Changes of NF- κ B activity in renal tissue in rats with postburn sepsis($\bar{x}\pm s, n=6$) A 值×面积

组别	NF- κ B 活性	组别	NF- κ B 活性
正常对照组	1.97±1.05	烫伤脓毒症 12 h 组	19.97±3.96**
烫伤脓毒症 1 h 组	34.69±1.65**	烫伤脓毒症 24 h 组	14.78±2.99**
烫伤脓毒症 2 h 组	20.79±2.68**	烫伤脓毒症 1 h+PDTC 组	17.41±3.02##
烫伤脓毒症 6 h 组	24.88±2.86**	烫伤脓毒症 2 h+PDTC 组	18.80±2.41

注:与正常对照组比较:**P<0.01;与烫伤脓毒症相应时间点组比较:##P<0.01

2.2 烫伤脓毒症大鼠血浆与肾组织 TNF- α 含量变化及 PDTC 对其的影响(表 2):大鼠烫伤脓毒症后 1 h 和 2 h 血浆与肾组织中 TNF- α 的含量较正常对照组均显著增高(P 均 <0.01)。PDTC 可于烫伤脓毒症后 1 h 和 2 h 明显降低血浆 TNF- α 水平,而对肾组织中 TNF- α 水平则无明显影响。

表 2 烫伤脓毒症大鼠血浆与肾组织 TNF- α 含量的变化($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Changes of TNF- α levels in plasma and renal tissue in rats

组别	血浆 TNF- α	肾组织 TNF- α
正常对照组	0.89 \pm 0.77	29.90 \pm 14.10
烫伤脓毒症 1 h 组	8.45 \pm 1.50**	90.80 \pm 23.70**
烫伤脓毒症 2 h 组	5.97 \pm 1.39**	120.90 \pm 36.40**
烫伤脓毒症 1 h+PDTC 组	2.81 \pm 0.81**	69.50 \pm 21.00
烫伤脓毒症 2 h+PDTC 组	3.15 \pm 1.07**	86.00 \pm 12.60

注:与正常对照组比较:** $P<0.01$;与烫伤脓毒症相应时间点组比较:** $P<0.01$

2.3 烫伤脓毒症大鼠 SCr 和 BUN 含量的变化及 PDTC 对其影响(表 3):烫伤脓毒症后 2 h 和 6 h 血浆中 BUN 和 SCr 含量均较正常对照组明显增高(P 均 <0.01),烫伤脓毒症后 6 h BUN 和 SCr 含量高于烫伤脓毒症 2 h($P<0.05$)。PDTC 对 BUN 和 SCr 含量均无显著影响。

表 3 烫伤脓毒症大鼠肾功能变化($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Changes of renal function in rats with postburn sepsis($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	BUN(mmol/L)	SCr(μ mol/L)
正常对照组	6.33 \pm 1.12	27.5 \pm 2.1
烫伤脓毒症 2 h 组	9.36 \pm 2.70**	103.5 \pm 24.4**
烫伤脓毒症 6 h 组	13.44 \pm 2.81** Δ	124.3 \pm 15.5** Δ
烫伤脓毒症 2 h+PDTC 组	8.86 \pm 1.29	79.0 \pm 19.8
烫伤脓毒症 6 h+PDTC 组	9.00 \pm 1.41	92.0 \pm 13.4

注:与正常对照组比较:** $P<0.01$;与烫伤脓毒症 2 h 组比较: $\Delta P<0.05$

3 讨论

1986 年 Sen 等^[8]从 B 淋巴细胞核抽提物中发现一种蛋白,它是一种能与免疫球蛋白 κ 链基因的增强子 κ B 序列(GGGACTTTCC)特异性结合的核蛋白因子,因而称为 NF- κ B。它广泛存在于静息细胞的细胞质中,其蛋白二聚体与 NF- κ B 特异性抑制蛋白 I κ B 形成三聚体,以非活化形式存在于细胞质中,当细胞受到细菌、细胞因子等刺激后,I κ B 可磷酸化而失活,进而使 NF- κ B 活化,进入细胞核内,启动基因转录。NF- κ B 调控许多在天然免疫应答中起重要作用的基因表达,其调控的基因包括有

编码细胞因子(如 IL-1、IL-2、IL-6、TNF- α)、黏附分子、急性期蛋白和多种酶类(如诱导型一氧化氮合酶、环氧合酶)的基因^[9]。另外,最近的研究证明,几种抗菌肽(如 β -防御素)的产生也受 NF- κ B 调控^[10]。其与脓毒症的发生和发展密切相关^[11,12]。肾脏是大面积烧伤和脓毒症损害最早的器官之一。本研究中发现,烫伤脓毒症大鼠肾脏中 NF- κ B 的活性于伤后 1 h 即明显增高,并持续较长时间。说明 NF- κ B 可能参与了脓毒症的发生以及脓毒症时肾损伤过程。NF- κ B 抑制剂 PDTC 为巯基化合物,通过抗氧化作用清除活性氧而抑制 I κ B 从 NF- κ B 二聚体上解离出,发挥其抑制 NF- κ B 活性的作用^[13]。由于 NF- κ B 活性在烫伤脓毒症后 1 h 和 2 h 就明显活化,因此我们观察了 PDTC 在烫伤脓毒症后 1 h 和 2 h 对肾脏 NF- κ B 活性的影响。研究发现,PDTC 可显著降低烫伤脓毒症后 1 h NF- κ B 活性,不能显著降低烫伤脓毒症后 2 h NF- κ B 活性。说明体内应用 PDTC 可以在一定程度上抑制烫伤脓毒症大鼠肾脏 NF- κ B 活性。

NF- κ B 调控 TNF- α 的基因表达,而 TNF- α 在脓毒症发病中起至关重要的作用。有研究表明,PDTC 可使脑外伤大鼠脑组织中升高的 TNF- α 明显降低^[14]。我们观察了烫伤脓毒症大鼠血浆及肾组织 TNF- α 水平的变化,由于 TNF- α 属于早期炎症介质,我们观察了其在烫伤脓毒症后 1 h 和 2 h 的变化。结果显示,在烫伤脓毒症后 1 h 和 2 h,大鼠血浆及肾组织 TNF- α 水平较正常对照组均明显增高;但 PDTC 只能降低血浆 TNF- α 水平,对肾组织 TNF- α 水平无显著影响。说明 PDTC 对全身炎症反应有一定的抑制作用,而对于肾脏局部炎症反应的抑制作用不明显。这可能是由于 PDTC 虽对肾脏 TNF- α 水平的抑制效应无统计学意义,但 PDTC 对多个器官综合作用的结果是明显抑制全身 TNF- α 水平。烫伤脓毒症大鼠血 SCr 和 BUN 均明显增高,说明此烫伤脓毒症模型动物肾功能受到明显损害。PDTC 并未有效降低血 SCr 和 BUN 水平,说明 PDTC 对全身炎症反应的下调并未对肾功能起到明显保护作用。

综上所述,本研究证实,烫伤脓毒症状态下,肾脏 NF- κ B 活性明显增高,它可能参与了脓毒症及脓毒症所致肾损伤的病理过程。NF- κ B 抑制剂 PDTC 可在一定程度上减轻循环血 TNF- α 等炎症细胞因子的合成与释放,但对肾脏局部炎症反应影响不大,对肾脏功能亦无明显保护作用。

参考文献:

- 姚咏明, 盛志勇. 重视对脓毒症本质的探讨[J]. 中华急诊医学杂志, 2005, 14: 185-186.
- 姚咏明, 盛志勇, 林洪远, 等. 脓毒症定义及诊断的新认识[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 321-324.
- 黎鳌, 主编. 烧伤治疗学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 104.
- Brown M A, Jones W K. NF- κ B action in sepsis; the innate immune system and the heart[J]. Front Biosci, 2004, 9: 1201-1217.
- Deryckere F, Gannon F. A one-hour miniprep technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues[J]. Biotechniques, 1994, 16: 405.
- 王勇, 黄文华. 一种改进的核转录因子的电泳迁移率改变分析法[J]. 第三军医大学学报, 2001, 21: 119-120.
- J·萨姆布鲁克, 主编. 金冬雁, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999. 880-897.
- Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences[J]. Cell, 1986, 46: 705-716.
- Xiao C, Ghosh S. NF- κ B, an evolutionarily conserved mediator of immune and inflammatory responses[J]. Adv Exp Med Biol, 2005, 560: 41-45.
- Diamond G, Kaiser V, Rhodes J, et al. Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells[J]. Infect Immun, 2000, 68: 113-119.
- 姚咏明, 盛志勇. 脓毒症信号转导机制的现代认识[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 3-6.
- Zingarelli B, Sheehan M, Wong H R. Nuclear factor- κ B as a therapeutic target in critical care medicine[J]. Crit Care Med, 2003, 31: S105-111.
- Nemeth Z H, Deitch E A, Szabo C, et al. Pyrrolidinedithiocarbamate inhibits NF- κ B activation and IL-8 production in intestinal epithelial cells[J]. Immunol Lett, 2003, 85: 41-46.
- 肖国民, 危静. 急性脑损伤大鼠脑组织核转录因子- κ B 活性及肿瘤坏死因子- α 表达的变化[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 307-308.

(收稿日期: 2005-10-24 修回日期: 2005-11-11)

(本文编辑: 郭方)

• 启事 •

第十三届中国科技论文统计结果

——各医药学类期刊影响因子较高的前 3 种期刊

2005 年 12 月 6 日中国科技信息研究所在北京国际会议中心公布了 2004 年度中国科技论文统计与分析结果。其中医药学中影响因子较高的 3 种期刊(根据 STPCD2004 年统计)分别如下。

学科	排序	期刊	影响因子	学科	排序	期刊	影响因子
预防医学与卫生学类	1	中华结核和呼吸杂志	2.134	临床医学类	1	中华创伤骨科杂志	1.563
	2	中华传染病杂志	1.190		2	中华医学感染学杂志	1.410
	3	中华流行病学杂志	0.998		3	中华检验医学杂志	1.215
基础医学、医学综合类	1	中华医学管理杂志	1.289	保健医学类	1	中国康复医学杂志	0.704
	2	中华病理学杂志	1.084		2	中华物理医学与康复杂志	0.674
	3	中国危重病急救医学	1.080		3	中国运动医学杂志	0.409
医科大学学报类	1	第一军医大学学报	0.869	妇产科学、儿科学类	1	中华儿科杂志	1.310
	2	北京大学学报医学报	0.634		2	中华妇产科杂志	1.237
	3	中国医学科学院学报	0.535		3	中国儿童保健杂志	0.715
药理学类	1	中国药理学报	0.912	神经病学、精神病学类	1	中华神经科杂志	1.152
	2	中国新药与临床杂志	0.806		2	中华神经外科疾病研究杂志	1.011
	3	药物不良反应杂志	0.727		3	中华精神科杂志	0.985
口腔医学类	1	中华口腔医学杂志	0.771	内科学类	1	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	2.654
	2	口腔医学	0.555		2	世界华人消化杂志	1.769
	3	口腔颌面修复学杂志	0.528		3	中华消化杂志	1.315
外科学类	1	中华烧伤杂志	1.250	眼科学、耳鼻咽喉科学类	1	中华耳鼻咽喉科杂志	0.996
	2	中华骨科杂志	1.165		2	中华眼科杂志	0.877
	3	中国实用外科杂志	0.975		3	眼外伤职业眼病杂志	0.451
肿瘤学类	1	中华肿瘤杂志	1.079	中医学与中药学类	1	中西医结合学报	0.866
	2	中华放射肿瘤学杂志	0.661		2	中国中西医结合杂志	0.708
	3	癌症	0.598		3	中国中西医结合急救杂志	0.705
军事医学与特种医学类	1	中华放射学杂志	1.290	护理学类	1	中华护理杂志	1.494
	2	中华超声影像学杂志	0.712		2	中国实用护理杂志	1.147
	3	中国内镜杂志	0.614		3	解放军护理杂志	0.655