

• 研究报告 •

# 甘氨酸对创伤性休克大鼠血单核细胞内核转录因子-κB 活性的影响

邓哲 刘德红 赵中江 孙冀武 谢玉刚 周泽强 姚彬 邱旻 王卫东

【关键词】 甘氨酸； 创伤性休克； 核转录因子-κB； 肿瘤坏死因子-α； 单核细胞

创伤性休克早期即有过度的炎症反应，细胞因子的“瀑布样”释放是引发创伤后全身炎症反应综合征(SIRS)及多器官功能障碍综合征(MODS)的重要原因之一。核转录因子-κB(NF-κB)是调节炎症反应的中枢环节，被认为是极具潜力的新型抗炎靶点<sup>[1]</sup>。甘氨酸可增加失血性休克、脓毒症及肝移植大鼠的生存率，对缺血/再灌注肝细胞以及肝脏具有保护作用，但确切机制尚未完全明确<sup>[2]</sup>。我们观察了应用甘氨酸后血单核细胞(BMCs)内 NF-κB 及其下游靶基因血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平的动态变化，探讨甘氨酸的作用机制。

## 1 材料与方

**1.1 实验动物及分组：**健康雄性成年 Wistar 大鼠 88 只(由中山大学实验动物中心提供)，体重 200~250 g，按随机数字表法分为对照组(24 只)、创伤性休克组(32 只)及甘氨酸治疗组(32 只)，各组再分为复苏后 3、6、12 和 24 h 4 个亚组，对照组每个时间点 6 只大鼠，休克组及治疗组每个时相间 8 只大鼠。

**1.2 创伤性休克动物模型制备：**以质量分数为 1% 的戊巴比妥(30 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠，行单侧颈动、静脉插管，颈动脉插管连接生理记录仪监测血压。稳定 10 min 后用 2 500 g 三棱皮带轮砸断大鼠双侧股骨中上段，监测血压，待平均动脉压降至 40 mm Hg(1 mm Hg = 0.133 kPa)，加压包扎双侧创面以减少进一步出血，并维持 90 min 后进行复苏，在此期间行一侧股动脉插管以备放血或采血检查各项指标。若血压不能降到 40 mm Hg，即采用股动脉快速放血使血压降低；当血压维持在 40 mm Hg 时，通过静脉持续少量输液维持，直至回输

基金项目：广东省深圳市科技计划基金资助项目(200602014)

作者单位：518035 广东，深圳市第二人民医院急诊科，深圳市急救医疗中心

作者简介：邓哲(1972-)，男(汉族)，湖南省人，医学硕士，主治医师，Email: dengz-163@163.com。

估计失血量的 40% 为止。休克 90 min 后回输 4~5 倍估计失血量的平衡液进行复苏，使血压恢复至伤前水平的 70% 以上并维持，缝合伤口。复苏前死亡的大鼠不计入本组实验，另取大鼠补充。

治疗组在复苏开始即经颈静脉输入 100 mg/kg 的甘氨酸 0.5 ml；休克组则给予等量生理盐水；对照组仅行腹腔麻醉，不受创伤亦不诱导休克。

## 1.3 检测指标及方法

**1.3.1 标本收集及光镜下观察：**于各时间点分别活杀大鼠，取股动脉血及肝脏标本。用全自动生化分析仪检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)含量。肝脏标本用体积分数为 10% 的中性甲醛水溶液固定，苏木素-伊红(HE)染色，光镜下观察肝细胞变性、坏死程度。肝组织损伤程度按肝小叶破坏数量的百分比计算，分为无(0%)、轻度(1%~25%)、中度(26%~50%)和重度(>50%)。

**1.3.2 BMCs 分离及核蛋白提取：**用 Ficoll 密度梯度离心法分离 BMCs，操作按美国 Active Motif 公司的核蛋白提取试剂盒(Nuclear Extract Kit)说明书进行。将分离的 BMCs 用含有蛋白酶抑制剂的冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次后，加入低渗缓冲液，冰浴 20 min，离心后去上清液，用裂解液重悬沉淀，冰浴 30 min 后离心，上清液中即含有核蛋白，每个样品的蛋白浓度采用考马斯亮蓝 G250 定量分装，-80 ℃ 冻存。每个样品取 5 μg 用于 NF-κB 分析测定。

**1.3.3 BMCs 核蛋白提取物中 NF-κB 活性及其特异性分析：**用酶联免疫吸附

法(ELISA)测定 NF-κB 活性，用美国 Active Motif 公司生产的 Trans AM™ ELISA 试剂盒。其原理是：利用 NF-κB 激活后能与核内特定 DNA 序列结合的特性，将一段能与 NF-κB p65 亚单位特异性结合的寡核苷酸链(5'-GGGAC TTTCC-3')预先包被于酶标板上，然后加入待测样品，标记有辣根过氧化物酶(HRP)的针对 NF-κB p65 亚单位的单克隆抗体与目的分子夹心结合，再加上底物，经过氧化物酶催化反应即显色。在酶标仪 450 nm 波长处检测吸光度(A)值，各样本孔内 A 值减去空白孔 A 值即为样本自身 A 值。同时在样本孔中分别加入突变型和野生型寡核苷酸链，野生型可抑制 NF-κB 的结合反应，而突变型对 NF-κB 的结合没有抑制作用，证明 NF-κB 与目的片段结合的特异性。

**1.3.4 血清 TNF-α 测定：**采用 ELISA 法，按试剂盒说明书操作。

**1.4 统计学分析：**用 SPSS 11.5 统计软件包，计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示，用 t 检验和方差分析，计数资料用  $\chi^2$  检验， $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 BMCs 内 NF-κB 和血清 TNF-α 水平的变化(表 1)：**复苏后 3 h，休克组及治疗组大鼠 BMCs 内 NF-κB 活性及血清 TNF-α 水平即明显增高，6 h 达高峰，此后呈下降趋势，各时间点均明显高于对照组( $P$  均  $< 0.01$ )。治疗组各时间点 BMCs 内 NF-κB 活性及血清 TNF-α 水平明显低于休克组( $P$  均  $< 0.01$ )。

**2.2 肝功能改变(表 2)：**休克组及治疗

表 1 各组大鼠 BMCs 内 NF-κB 活性及血清 TNF-α 水平的比较( $\bar{x} \pm s$ )

指标	组别	复苏后 3 h	复苏后 6 h	复苏后 12 h	复苏后 24 h
NF-κB (A 值)	对照组	0.069±0.005(6)	0.073±0.006(6)	0.070±0.005(6)	0.074±0.004(6)
	休克组	0.176±0.015(8) <sup>b</sup>	0.523±0.029(8) <sup>b</sup>	0.385±0.019(8) <sup>b</sup>	0.297±0.020(8) <sup>b</sup>
	治疗组	0.108±0.010(8) <sup>bc</sup>	0.289±0.016(8) <sup>bc</sup>	0.239±0.013(8) <sup>bc</sup>	0.199±0.015(8) <sup>bc</sup>
TNF-α (ng/L)	对照组	92.8±7.9(6)	95.8±8.2(6)	93.1±8.3(6)	94.5±7.8(6)
	休克组	289.2±18.8(8) <sup>b</sup>	638.7±32.2(8) <sup>b</sup>	468.6±26.3(8) <sup>b</sup>	388.6±22.5(8) <sup>b</sup>
	治疗组	192.6±13.3(8) <sup>bc</sup>	366.4±19.8(8) <sup>bc</sup>	279.9±16.3(8) <sup>bc</sup>	208.1±14.8(8) <sup>bc</sup>

注：与对照组同期比较，<sup>b</sup> $P < 0.01$ ；与休克组同期比较，<sup>c</sup> $P < 0.01$

组复苏后 3 h 起血清 ALT 含量均呈逐渐增高趋势,与对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。治疗组复苏后各时间点 ALT 均较休克组降低( $P$  均  $< 0.01$ )。

**2.3 光镜下观察:**对照组大鼠肝脏显示正常的肝小叶结构,汇管区结构清晰,肝细胞形态正常,肝窦结构正常。休克组复苏后 3 h 即有肝窦扩张、淤血,内有中性粒细胞浸润;肝小叶结构紊乱,部分肝细胞变性、坏死;复苏后 24 h,大鼠肝脏汇管区有大量炎性细胞浸润,肝细胞坏死明显,呈大片状,部分小叶结构破坏。治疗组发生轻度及以上病理损伤的动物数要少于休克组(24 比 32,  $P < 0.01$ , 表 3)。

表 3 各组肝组织损害程度比较 只

组别	动物数	无	轻度	中度	重度
对照组	24	24	0	0	0
休克组	32	0	22	8	2
治疗组	32	8	19	5	0

**3 讨论**

NF- $\kappa$ B 是一种能与多种细胞基因启动子和增强子中的  $\kappa$ B 序列位点发生特异结合的核转录因子,是多种信号转导途径的汇聚点,其活化和移位入细胞核后介导炎症细胞因子转录,具有广泛的生物学活性。NF- $\kappa$ B 在 SIRS 及 MODS 的发病中担当重要角色:①高效诱导多种细胞因子、黏附分子、趋化因子和急性期反应蛋白的基因表达,同时对参与炎症反应放大与延续(即“级联瀑布效应”)的多种酶基因表达也具有重要调控作用<sup>[3-5]</sup>;②调控内皮细胞和白细胞等炎性细胞的活化;③促进中性粒细胞积聚及与内皮细胞黏附;④促进内皮细胞凋亡,抑制中性粒细胞凋亡,导致炎症失控,最后导致 MODS,甚至死亡<sup>[6]</sup>。我们在前期研究中已经证实,存活组失血性休克大鼠外周血单核细胞(PBMC)中 NF- $\kappa$ B 活性随创伤后时间的延长逐渐升高,且明显高于死亡组,说明 PBMC 中 NF- $\kappa$ B 与预后相关<sup>[7]</sup>。TNF- $\alpha$  是其中重要的促炎症细胞因子之一,将高度纯化重组人 TNF- $\alpha$  经静脉注入动物体内,当血中浓度达到感染性休克水平时, TNF 诱发的血流动力学以及细胞和组织损伤的病理变化均与休克时相同,研究表明,肝、肾、肺、肠组织中 TNF- $\alpha$  含量与相应脏器的损伤程度及功能状态平行,其过度产生与低血压、终末器官功能障碍及死亡密

表 2 各组大鼠血清 ALT 含量的变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	复苏后 3 h	复苏后 6 h	复苏后 12 h	复苏后 24 h	U/L
对照组	36.7 $\pm$ 3.9(6)	37.5 $\pm$ 4.2(6)	37.2 $\pm$ 3.9(6)	36.9 $\pm$ 4.0(6)	
休克组	69.5 $\pm$ 8.5(8) <sup>b</sup>	99.6 $\pm$ 15.2(8) <sup>b</sup>	128.1 $\pm$ 31.6(8) <sup>b</sup>	156.7 $\pm$ 21.1(8) <sup>b</sup>	
治疗组	42.4 $\pm$ 5.1(8) <sup>bc</sup>	63.8 $\pm$ 7.0(8) <sup>bc</sup>	72.4 $\pm$ 11.9(8) <sup>bc</sup>	93.9 $\pm$ 18.4(8) <sup>bc</sup>	

注:与对照组同期比较,\* $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与休克组同期比较,<sup>c</sup> $P < 0.01$

切相关<sup>[8]</sup>。在创伤性休克时,应激、缺血、缺氧、再灌注损伤导致巨噬细胞、多形核白细胞和血小板等效应细胞被激活,失控性释放细胞因子或炎症介质,产生 SIRS、MODS 甚至死亡。国内外学者基于对 MODS 即为炎症介质介导的“介质病”这一认识,研制、应用一系列针对炎症介质如白细胞介素-6(IL-6)、TNF- $\alpha$  等抗炎手段,对缓解机体的过度炎症反应、减轻靶器官损害有一定疗效,但由于众多炎症介质(包括尚未发现的炎症介质)构成的复杂网络及炎症介质过度释放时形成的“瀑布效应”,使得针对单一(或少量)炎症介质的逐一对抗措施显得力不从心。

甘氨酸是天然无毒、构成蛋白质分子质量最小的氨基酸,其作为合成机体蛋白质的非必需氨基酸和中枢神经系统的抑制性神经递质早已被人们所熟知。1987 年 Weinberg 等<sup>[9]</sup>首次发现甘氨酸对离体器官的保护作用,其作用机制及对肝、肾、肺等脏器的保护作用越来越受到人们重视。研究表明,甘氨酸可增加失血性休克、脓毒症及肝移植大鼠生存率,具有细胞保护作用,对缺血/再灌注肝细胞有保护作用<sup>[2]</sup>。其可能机制为:①通过甘氨酸门控的 Cl<sup>-</sup> 通道,抑制蛋白酶活性;②调控肝非实质细胞,防止库普弗细胞活化,减轻肝窦内皮细胞的损伤和凋亡;③抑制 Ca<sup>2+</sup> 超载,减少库普弗细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度;④具有免疫调节和抗炎作用,可减轻中性粒细胞的脂质过氧化反应;⑤改善肝内微灌注及肝组织内缺氧;⑥减少库普弗细胞来源细胞因子的活化<sup>[2,10-11]</sup>。本结果表明,大鼠 BMCs 内 NF- $\kappa$ B 和血清 TNF- $\alpha$  在创伤性休克复苏后 3 h 即增加,6 h 同时达高峰,此后又同步下降,24 h 仍高于对照组;血清 ALT 在复苏后 3 h 也升高,且随时间延长逐渐增高,24 h 仍未下降;光镜下病理学改变也随时间延长而呈加重趋势。甘氨酸能明显降低复苏后各时间点大鼠的 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  及 ALT 水平,改善休克大鼠肝组织病理学改变,可有效防治创伤性休克后继发的肝脏损害。

**参考文献**

- [1] Nishiura T, Nishimura T, deSerres S, et al. Gene expression and cytokine and enzyme activation in the liver after a burn injury [J]. J Burn Care Rehabil, 2000, 21(2): 135-141.
- [2] Zhong Z, Wheeler M D, Li X, et al. L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2003, 6(2): 229-240.
- [3] 廖建坤, 廖红梅, 罗学红. 核转录因子- $\kappa$ B 在烧伤早期的活性变化及意义 [J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(4): 220-221.
- [4] 刘瑞林, 刘牧林, 马良龙. 大黄素对重症胰腺炎大鼠核转录因子- $\kappa$ B 表达变化的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(4): 230-232.
- [5] 蔣丽. 大黄对脓毒症大鼠因子- $\kappa$ B 活化的抑制作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(6): 364-367.
- [6] 梁华平, 王正国, 朱佩芳. 针对 SIRS 的新型抗炎靶点及抗炎策略研究进展——从炎症介质到核因子- $\kappa$ B [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(11): 649-652.
- [7] 赵中江, 孙冀武, 邓哲. 不同方式液体复苏对失血性休克大鼠外周血单个核细胞中核转录因子- $\kappa$ B 活性的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(5): 299-302.
- [8] Fang C W, Yao Y M, Zhai H X, et al. Tissue lipopolysaccharide-binding protein expression in rats after thermal injury: potential role of TNF- $\alpha$  [J]. Burns, 2004, 30(3): 225-231.
- [9] Weinberg J M, Davis J A, Abarzua M, et al. Cytoprotective effects of glycine and glutathione against hypoxic injury to renal tubules [J]. J Clin Invest, 1987, 80(5): 1446-1454.
- [10] 王钢, 王恩华. 甘氨酸对出血性休克大白鼠生存率的影响 [J]. 中华外科杂志, 2004, 42(5): 296-301.
- [11] Grotz M R, Pape H C, van Griensven M, et al. Glycine reduces the inflammatory response and organ damage in a two-hit sepsis model in rats [J]. Shock, 2001, 16(2): 116-121.

(收稿日期: 2008-04-03)

(本文编辑: 李银平)