

• 论著 •

醒脑静注射液对内毒素诱导大鼠肺泡巨噬细胞
核转录因子- κ B 激活和细胞因子产生的影响王 进¹, 杨光田¹, 乔礼芬², 李永胜¹

(华中科技大学同济医学院附属同济医院①急诊科, ②呼吸科, 湖北 武汉 430030)

【摘要】 目的 探讨内毒素诱导大鼠肺泡巨噬细胞(AMs)核转录因子- κ B(NF- κ B)的激活和细胞因子的释放以及醒脑静注射液(XNJ)的干预作用。方法 通过支气管肺泡灌洗获取大鼠 AMs。先用 XNJ(10 ml/L)孵育 AMs 2 h 后,加入内毒素(10 μ g/L)分别刺激 2、4 和 6 h。用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 AMs 中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)基因表达水平;用酶联免疫吸附法(ELISA)检测培养上清液中 TNF- α 和白细胞介素-8(IL-8)含量;蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 AMs 中 NF- κ B 抑制蛋白- α (I κ B- α)、磷酸化 I κ B- α (pI κ B- α)和 NF- κ B 的水平变化。结果 内毒素能增加 AMs 中 TNF- α 基因表达水平和培养上清液中 TNF- α 、IL-8 的水平,同时能促进 I κ B- α 降解和 NF- κ B 激活。与内毒素组比较,XNJ 能减少 AMs 中 TNF- α 基因表达水平和培养上清液中 TNF- α 和 IL-8 的水平;抑制内毒素诱导的 I κ B- α 降解和 NF- κ B 激活(P 均 <0.05)。结论 XNJ 通过抑制 AMs 中 I κ B- α 的降解,减少了 NF- κ B 的激活,减少了内毒素诱导大鼠 AMs 细胞因子的产生。

【关键词】 核转录因子- κ B; 醒脑静注射液; 细胞因子; 肺泡巨噬细胞

中图分类号:R285.5;Q786 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2008)04-0212-04

Effects of Xingnaojing injection (醒脑静注射液) on lipopolysaccharide-induced nuclear factor- κ B activation and cytokine production in rat alveolar macrophages WANG Jin¹, YANG Guang-tian¹, QIAO Li-fen², LI Yong-sheng¹. ①Department of Emergency; ② Department of Respiratory Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China
Corresponding author: YANG Guang-tian (Email:Guangtiany@hotmail.com)

【Abstract】 Objective To study the effects of Xingnaojing injection (XNJ, 醒脑静注射液) on lipopolysaccharide (LPS)-induced nuclear factor kappa B (NF- κ B) activation and cytokine release in rat alveolar macrophages (AMs). **Methods** AMs were collected from bronchoalveolar lavage fluid in rats. The AMs were incubated for 2 hours with XNJ (10 ml/L), and then stimulated for 2, 4 and 6 hours by LPS (10 μ g/L). Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the gene levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the protein levels of TNF- α and interleukin-8 (IL-8) in the supernatant fluid of the culture. Western blotting was used to detect the levels of NF- κ B inhibitory protein- α (I κ B- α), phosphorylated-I κ B- α (pI κ B- α) and NF- κ B in the AMs. **Results** LPS increased the gene expression level of TNF- α in AMs and TNF- α and IL-8 contents in the supernatant fluid of the AMs culture; in the mean time LPS promoted the degradation of I κ B- α and NF- κ B activation. Compared with LPS group, XNJ decreased the gene expression level of TNF- α in the AMs and the TNF- α and IL-8 release in the supernatant fluid; XNJ inhibited I κ B- α degradation and NF- κ B activation induced by LPS (all $P < 0.05$). **Conclusion** XNJ can attenuate LPS-induced cytokine production in rat AMs by inhibiting I κ B- α degradation and NF- κ B activation in AMs.

【Key words】 nuclear factor kappa B; Xingnaojing injection; cytokine; alveolar macrophages

在多器官功能衰竭(MOF)的发展过程中,呼吸系统是最容易受累的器官,同时呼吸衰竭往往是 MOF 的第一步^[1]。急性炎症因子释放和活化的中性

粒细胞进入肺脏是急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的重要发病机制,这些炎症反应主要是由肺泡巨噬细胞(AMs)释放的细胞因子所引起的。AMs 是肺脏炎症因子的主要来源,AMs 产生的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)和 IL-6 等细胞因子可以引起中性粒细胞的激活,促进与内皮细胞的黏附,导致微血管内血栓形成和血管张力的改变^[2-5],

基金项目:湖北省科技攻关项目(2003AA301C51)

通讯作者:杨光田,Email:Guangtiany@hotmail.com

作者简介:王 进(1978-),男(汉族),山东省人,博士研究生,

Email:er_healing@yahoo.com.cn.

其中, TNF- α 和 IL-1 β 是引起炎症反应的主要因子。AMs 释放的 IL-8 是中性粒细胞趋化因子^[6], IL-8 在 ARDS 时诱导中性粒细胞向肺脏募集发挥了重要作用。核转录因子- κ B (NF- κ B) 是调节 TNF- α 和 IL-8 基因表达的关键细胞转录因子, 静息状态下, NF- κ B 与 NF- κ B 抑制蛋白- α (I κ B- α) 结合, 存在于胞质中。内毒素刺激 AMs 引起的 NF- κ B 激活在 ARDS 发生过程中发挥了重要作用^[7]。醒脑静注射液 (XNJ) 是由安宫牛黄丸经减味而成, 具有清热解毒、抗炎的作用^[8], 能抑制 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 表达, 减轻脑损伤^[9]; 抑制家兔血浆和脑组织中细胞因子的释放, 保护脑缺血/再灌注损伤^[10]; 抑制单核细胞与脑微血管内皮细胞的黏附和炎症因子的释放^[11]。我们既往的研究表明, XNJ 能减轻内毒素诱导全身炎症反应综合征 (SIRS) 大鼠细胞因子的产生和肺损伤^[12], 现探讨 XNJ 能否抑制内毒素刺激引起 AMs 的 TNF- α 和 IL-8 产生以及这种抑制作用是否通过抑制 NF- κ B 的激活来实现肺保护作用。

1 材料与方法

1.1 大鼠 AMs 的培养: 成年健康雄性 Wistar 大鼠 (由华中科技大学同济医学院动物中心提供), 体重 250~300 g, 腹腔注射戊巴比妥 (50 mg/kg) 麻醉。根据文献 [13] 的方法, 通过支气管肺泡灌洗获取 AMs。将细胞浓度调整为 1×10^6 /L, 接种到 6 孔培养板中, 于 CO₂ 培养箱中贴壁培养 2 h。将贴壁细胞用瑞氏染色和小鼠抗大鼠 CD68 单克隆抗体 (单抗) 鉴定为 AMs, 锥虫蓝染色测定 AMs 存活率。细胞培养 24 h 后进行实验。细胞分为对照 (0 h) 组、内毒素组、XNJ 组, 后两组再分为 2、4 和 6 h 亚组。将细胞用无血清的 RPMI1640 培养基培养, 内毒素组加入 10 μ g/L 内毒素; XNJ 组预先加入 10 ml/L XNJ 培养 2 h 后, 再加入 10 μ g/L 内毒素; 对照组只加入 1 ml RPMI1640 培养基。

1.2 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 TNF- α 的基因表达: 取各组细胞依次加入 TRIzol、氯仿、异丙醇抽提总 RNA, 70 $^{\circ}$ C 保存。总 RNA 以莫洛尼鼠白血病病毒 (MMLV) 逆转录酶进行逆转录。采用 Primer 5.0 软件设计引物, 均由上海生工合成。引物序列: TNF- α 上游: 5'-TAGCAAACCAAGCA G-3'; 下游: 5'-GGTATGAAATGGCAAATCG-3', 扩增产物大小为 210 bp; β -肌动蛋白 (β -actin) 上游: 5'-ACCCAGATCATGTTTGAGACCT-3'; 下游: 5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3', 扩增产物大小为 644 bp。PCR 反应条件: 变性 94 $^{\circ}$ C 4 min,

退火 49 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环, 最后 1 个循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳, 每组实验重复 3 次, 用 Quantity one 4.6 软件分析扩增产物条带的灰度值, 以 TNF- α / β -actin 的比值作为 mRNA 水平的半定量指标。

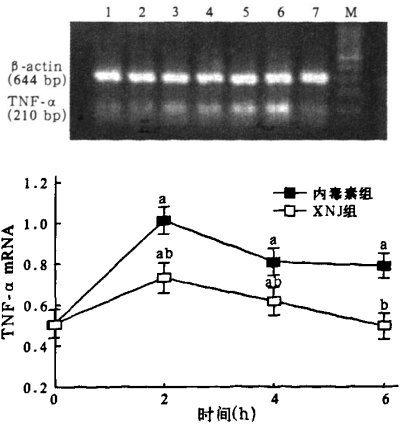
1.3 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 TNF- α 和 IL-8 水平: 细胞培养上清液中 TNF- α 和 IL-8 水平测定按 ELISA 试剂盒说明书要求操作。

1.4 蛋白质免疫印迹法 (Western blotting) 检测 I κ B- α 、磷酸化 I κ B- α (pI κ B- α) 和 NF- κ B 水平: 采用蛋白提取试剂盒提取 AMs 的胞质蛋白与核蛋白, 操作按说明书要求进行。取 100 μ g 蛋白, 变性后经聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭, 加兔抗 I κ B- α 单抗、小鼠抗大鼠 pI κ B- α 多克隆抗体 (多抗)、小鼠抗大鼠 NF- κ B 多抗以及兔抗大鼠 β -actin 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗室温孵育 1 h 后用增强化学发光 (ECL) 试剂盒检测。每组实验重复 3 次, 用 Quantity one 4.6 软件分析蛋白条带的灰度值。以 I κ B- α / β -actin、pI κ B- α / β -actin 和 NF- κ B/ β -actin 的比值作为蛋白水平的定量指标。

1.5 统计学分析: 用 SPSS 13.0 软件分析实验数据, 检测结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 *F* 检验和 *q* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

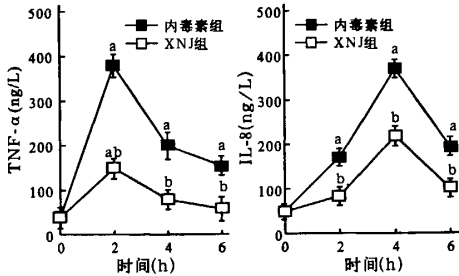
2.1 TNF- α 基因表达水平 (图 1): 内毒素刺激后, TNF- α mRNA 水平以 2 h 最高, 然后逐渐下降, 除逐渐 XNJ 组 6 h 外, 各组与对照 (0 h) 组比较差异均有统计学意义 (*P* 均 < 0.05); XNJ 组各时间点 TNF- α mRNA 水平均低于内毒素组 (*P* 均 < 0.05)。



1~7 依次为 XNJ 组 6、4 和 2 h, 内毒素组 6、4、2 和 0 h; M: Marker; 与对照 (0 h) 组比较, **P* < 0.05; 与内毒素组同期比较, ^b*P* < 0.05

图 1 各组大鼠 AMs 培养液中 TNF- α 基因表达水平

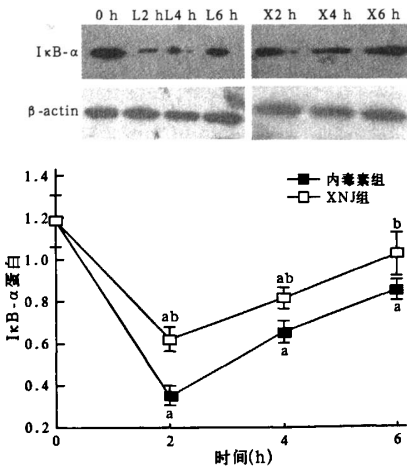
2.2 TNF- α 和 IL-8 蛋白水平(图 2):与对照(0 h)组比较,内毒素组各时间点 TNF- α 和 IL-8 水平均升高(P 均 <0.05),其中 TNF- α 以 2 h 最高,IL-8 以 4 h 最高。XNJ 组各时间点 TNF- α 和 IL-8 水平均低于内毒素组(P 均 <0.05)。



注:与对照组(0 h)比较, $^aP<0.05$;与内毒素组同期比较, $^bP<0.05$

图 2 各组大鼠 AMs 培养液中 TNF- α 和 IL-8 蛋白水平

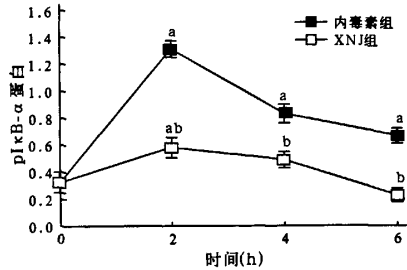
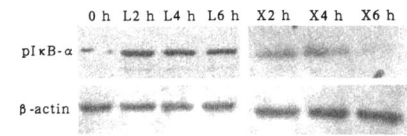
2.3 I κ B- α 和 pI κ B- α 水平(图 3,图 4):内毒素组 I κ B- α 水平先降低后升高,以 2 h 最低,各时间点 I κ B- α 水平均低于对照(0 h)组(P 均 <0.05);内毒素组 pI κ B- α 水平先升高后降低,以 2 h 最高,各时间点 pI κ B- α 水平均高于对照组(P 均 <0.05);XNJ 组各时间点 I κ B- α 水平均高于内毒素组,pI κ B- α 水平均低于内毒素组(P 均 <0.05)。



L:内毒素组;X:XNJ 组;与对照(0 h)组比较, $^aP<0.05$;与内毒素组同期比较, $^bP<0.05$

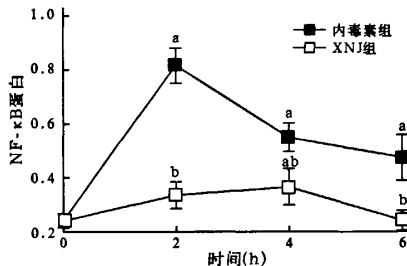
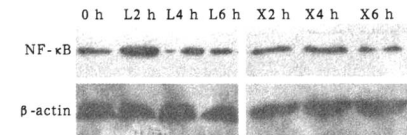
图 3 各组大鼠 AMs 培养液中 I κ B- α 蛋白表达水平

2.4 NF- κ B 水平(图 5):与对照(0 h)组比较,内毒素组各时间点 NF- κ B 水平均升高(P 均 <0.05),其中以 2 h 水平最高;XNJ 组各时间点 NF- κ B 水平均低于内毒素组(P 均 <0.05)。



L:内毒素组;X:XNJ 组;与对照(0 h)组比较, $^aP<0.05$;与内毒素组同期比较, $^bP<0.05$

图 4 各组大鼠 AMs 培养液中 pI κ B- α 蛋白表达水平



L:内毒素组;X:XNJ 组;与对照(0 h)组比较, $^aP<0.05$;与内毒素组同期比较, $^bP<0.05$

图 5 各组大鼠 AMs 培养液中 NF- κ B 蛋白表达水平

3 讨论

研究发现,XNJ 可以抑制炎症介质产生,稳定细胞内环境,减轻肺间质水肿、减少微血栓形成等,从而减轻颅脑损伤患者的肺损害^[14]。我们既往研究也发现,XNJ 能减轻内毒素诱导 SIRS 大鼠的肺损伤^[12]。本研究中发现,与内毒素组各时间点比较,XNJ 能够减少内毒素诱导大鼠 AMs 细胞因子的释放;降低 pI κ B- α 水平,减少 I κ B- α 降解,抑制 NF- κ B 的激活。结果表明,XNJ 通过减少 I κ B- α 降解,抑制 NF- κ B 激活。I κ B- α 磷酸化、泛素化和蛋白酶体依赖的降解途径调控了 NF- κ B 的激活^[15-16]。

TNF- α 是急性肺损伤(ALI)早期重要的促炎因子,主要由细菌内毒素刺激 AMs 产生。本研究显示,XNJ 能减少内毒素诱导 TNF- α mRNA 的表达,

表明 XNJ 能在转录水平上抑制 TNF- α 的产生。我们同时发现,内毒素刺激可促进 AMs 产生 IL-8,并在 4 h 时达最高水平,而 TNF- α 最高水平却在 2 h,说明 TNF- α 本身可以进一步促进 IL-8 释放。因此,本结果表明,TNF- α 可促进和上调其他促炎因子的产生,同时 TNF- α 和 IL-8 具有中性粒细胞趋化作用,能促进中性粒细胞与血管内皮细胞的黏附,从而造成肺组织的损伤。而 XNJ 能减少内毒素诱导的 TNF- α 和 IL-8 产生。

NF- κ B 是调节 TNF- α 和 IL-8 基因转录的关键转录因子,NF- κ B 活化后可启动和调控一系列参与炎症反应的炎症因子基因表达(如促炎细胞因子 TNF- α 、IL-8、黏附分子和环氧化酶等),介导 ARDS 的发生^[17-19]。NF- κ B 的不适当激活在病理性炎症过程中起关键作用,因此,NF- κ B 可作为一个潜在的治疗靶点来减轻组织损伤,直接针对 NF- κ B 的异常激活,而不是对各个细胞因子分而治之,将会产生更好的治疗效果。本研究中发现,XNJ 能抑制内毒素诱导的 AMs 中 NF- κ B 激活,说明 NF- κ B 可能是 XNJ 发挥抗炎作用的上游通路。I κ B 磷酸化后激活 NF- κ B,细胞未受刺激时,NF- κ B 与 I κ B- α 相互作用存在于胞质中,当细胞受到外部的炎症刺激(如内毒素、细胞因子、病毒等)时,I κ B 的 N-末端区域首先被磷酸化,然后被泛素化,最终被蛋白酶体降解,此时,NF- κ B 与 I κ B 解离并进入细胞核,与炎症因子基因上的 DNA 序列相结合,从而启动基因的转录^[20]。为了探讨 XNJ 抑制 NF- κ B 的上游机制,我们进一步研究了 XNJ 对 I κ B- α 蛋白水平的影响,结果表明,XNJ 可减少内毒素刺激引起的 I κ B- α 水平下降,即 XNJ 抑制了 I κ B- α 的降解。

综上所述,XNJ 能在转录水平上减少内毒素诱导的 TNF- α 表达,并抑制 TNF- α 和 IL-8 的释放。这种抗炎机制是通过减少 I κ B- α 降解、抑制 NF- κ B 激活实现的。

参考文献

- [1] Baue A E, Durham R, Faist E. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle[J]. Shock, 1998, 10(2): 79-89.
- [2] Humphrey D M, McManus L M, Hanahan D J, et al. Morphologic basis of increased vascular permeability induced by acetyl glyceryl ether phosphorylcholine[J]. Lab Invest, 1984, 50(1): 16-25.
- [3] Shaw J O, Pinckard R N, Ferrigni K S, et al. Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine (platelet activating factor) [J]. J Immunol, 1981, 127(3): 1250-1255.
- [4] Yasaka T, Boxer L A, Baehner R L. Monocyte aggregation and superoxide anion release in response to formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) and platelet-activating factor (PAF) [J]. J Immunol, 1982, 128(5): 1939-1944.
- [5] Benveniste J, Boullet C, Brink C, et al. The actions of Paf-acether (platelet-activating factor) on guinea-pig isolated heart preparations[J]. Br J Pharmacol, 1983, 80(1): 81-83.
- [6] Baggiolini M, Loetscher P, Moser B. Interleukin-8 and the chemokine family [J]. Int J Immunopharmacol, 1995, 17(2): 103-108.
- [7] Cao L, Qian L L, Zhu Y R, et al. Regulation of activity of nuclear factor- κ B and activator protein-1 by nitric oxide, surfactant and glucocorticoids in alveolar macrophages from piglets with acute lung injury[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(12): 1316-1323.
- [8] 曹书华, 王今达. 多器官功能障碍综合征中西医结合诊疗标准的探讨[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(5): 259-263.
- [9] 陈坚, 张素平, 徐武华, 等. 醒脑静注射液对急性脑出血患者血中细胞因子水平影响的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(4): 224-226.
- [10] 陈寿权, 王万铁, 王明山, 等. 醒脑静对家兔脑缺血再灌注时 TNF、IL-1 β 、IL-6 水平及脑超微结构影响的实验研究[J]. 中国急救医学, 2000, 20(11): 637-639.
- [11] 李志刚, 刘松青, 王章阳. 醒脑静注射液的体外抗多形核白细胞与血管内皮细胞黏附的效果[J]. 中国药房, 2003, 14(6): 333-334.
- [12] 杨光田, 王进. 醒脑静对内毒素致大鼠全身炎症反应综合征的影响[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(15): 1142-1145.
- [13] Leeper-Woodford S K, Detmer K. Acute hypoxia increases alveolar macrophage tumor necrosis factor activity and alters NF- κ B expression[J]. Am J Physiol, 1999, 276(6 Pt 1): L909-916.
- [14] 余丹凤, 沈盛晖, 张庚, 等. 醒脑静注射液对重症颅脑损伤患者细胞因子及肺部感染的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(5): 289-291.
- [15] Stancovski I, Baltimore D. NF- κ B activation: the I κ B kinase revealed[J]. Cell, 1997, 91(3): 299-302.
- [16] Thanos D, Maniatis T. NF- κ B: a lesson in family values [J]. Cell, 1995, 80(4): 529-532.
- [17] 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(6): 334-337.
- [18] 张秋金, 沈洪, 张维, 等. 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[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(6): 370-372.
- [19] 刘牧林, 刘瑞林, 马良龙. 核转录因子- κ B 在大鼠急性胰腺炎发病机制中的作用研究[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(7): 434-435.
- [20] Baeuerle P A. I κ B-NF- κ B structures: at the interface of inflammation control [J]. Cell, 1998, 95(6): 729-731.

(收稿日期: 2007-11-05 修回日期: 2008-01-03)

(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ①天津生化制药有限公司: 注射用氢化可的松琥珀酸钠 …………… (封二)
- ②天津红日药业: 血必净注射液 …………… (封底)