·基础研究·

NF-κB在多器官功能不全实验模型中的活性变化

鲍国强 章扬培 王德文 王士雯

【摘要】 **目的** 研究NF-κB在多器官功能不全小鼠各脏器中的活性变化，以期探讨其在多器官功能不全发生过程中的作用。**方法** 利用酵母多糖制作多器官功能不全综合征的小鼠模型，提取小鼠脏器的细胞核蛋白，用凝胶阻滞分析方法观察NF-κB的活性变化。**结果** 酵母多糖腹腔注射后，小鼠发生了三个阶段的生理学变化，表现为体温和体重的波动；在第三阶段小鼠脏器发生了严重的病理学改变。同时，NF-κB的DNA结合活性有显著性增加。**结论** 酵母多糖有效地诱发了小鼠发生多器官功能不全综合征。在此模型小鼠的各脏器中，NF-κB活性显著性增加，提示NF-κB可能是多功能不全发生过程中的一个关键的转录因子。

【关键词】 酵母多糖；NF-κB；多器官功能不全综合征

NF-κB activity in experimental model for multiple organ dysfunction syndrome

BAO Guoqiang[1], *ZHANG Yangpei*[1], *WANG Dewen*[1], *WANG Shiwen*[2]

1. *Institute of Blood Transfusion, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing* 100850, *China*
2. *Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing* 100853, *China*

【**Abstract**】 **Objective** Nuclear factor κB (NF-κB) is a ubiquitous transcription factor in mammalian cells. It was reported that NF-κB regulated the expression of genes responsible for multiple biological processes including immune responses, inflammatory reaction, cell proliferation and apoptosis. The present study was to examine the changes in activity of NF-κB in the mouse organ with multiple organ dysfunction syndrome(MODS) in order to study the function of NF-κB in the development of this syndrome. **Methods** Mouse model for MODS was formed by zymosan intraperitoneal injection. Nuclear extracts from the organs of MODS model were examined by electrophoretic mobility shift assays (EMSA) to assay the activity of NF-κB. **Results** Three phases of physiological changes developed after zymosan intraperitoneal injection and were characterized by the changes in body weight and temperature. Mouse organs developed severe inflammation and the activity of NF-κB increased remarkably. **Conclusion** Mouse model for MODS was formed successfully by zymosan treatment and NF-κB activity increased in this model. The results suggest that NF-κB play an important role in the development of MODS.

【**Key words**】 zymosan; NF-κB; MODS

NF-κB(nuclear factor-κB)是一个存在于哺乳动物细胞中的转录因子，它与机体的炎症反应和免疫反应密切相关。为了探讨NF-κB是否参与了多器官功能不全综合征(multiple organs dysfunction syndrome,MODS)的发生与发展过程，本文利用酵母多糖诱导C57BL/6N小鼠发生多器官衰竭，观察器质性病变及免疫炎症反应，并检测了NF-κB在发生MODS的小鼠脏器中活性的变化，为临床防治MODS奠定理论基础。

1 实验材料与试剂

1.1 实验动物 C57BL/6N雄性小鼠(7周，~20 g)由军事医学科学院生物工程研究所提供。

1.2 试剂 酵母多糖(zymosan-A)购自Sigma公司；液体石蜡为北京试剂厂化学纯试剂；γ-P^{32}ATP购自亚辉公司；寡核苷酸由大连宝生物工程公司合成；

基金项目：国家重点基础研究发展规划项目(编号G2000057004)

作者单位：100850 北京市，军事医学科学院野战输血研究所(鲍国强、章扬培)；放射医学研究所(王德文)；100853 北京市，解放军总医院老年心血管病研究所(王士雯)

作者简介：鲍国强，男，在读医学博士

通讯作者：章扬培，电话：010-66930920

万方数据

BCA-200 Protein Assay Kit 购自 Pierce 公司;其他试剂均为化学纯。

2 实验方法

2.1 酵母多糖诱发 MODS 小鼠模型的制备[1,2] (1)将酵母多糖置于无菌的液体石蜡中,高速涡旋 1 h,配制成 25 mg/ml 的液体石蜡匀相悬浊液,于 100℃水浴灭菌 80 min,使用前在 40℃下高速涡旋 15 min。(2)将 22 只 C57BL/6N 雄性小鼠分为实验组(14 只)与对照组(8 只),称重后按 1 mg/g 体重腹腔注射酵母多糖液体石蜡悬浊液,对照组以等量方式注射液体石蜡。

2.2 观察及染色 自注射天起连续观察小鼠的生长状况 12 d,记录小鼠的体温及体重变化。自注射起 12 d 后拉颈处死小鼠,取出小鼠心脏、肝脏和肺脏置于 10% 福尔马林溶液中固定 1 周,制作石蜡切片。取部分切片做苏木精与伊红(HE)染色,观察小鼠各脏器发生的病理学改变。

2.3 检测 取部分小鼠脏器提取核蛋白,凝胶阻滞分析(EMSA)法检测转录因子 NF-κB 活性的变化,具体方法见文献 3。统计学采取 t 检验,结果表示为 $\bar{x} \pm s$。

3 实验结果

3.1 腹腔注射酵母多糖后小鼠的生理及病理学改变

酵母多糖是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞壁上的一种成分,被广泛用于诱发动物的炎症反应及诱导 MODS 动物模型[4]。腹腔注射酵母多糖后的小鼠发生了三个阶段的病理变化。在第一阶段(0~2 d)中,小鼠活动力明显降低,同时伴有腹泻,体重下降,实验组有 3 只(21.4%)小鼠死亡。2 d 过后进入第二阶段,小鼠活力状态有所恢复,体重有所上升,在此期间(3~7 d)无小鼠死亡。进入第三阶段(8~12 d)后,小鼠重新显示出患病状态,体温降低(图 1A),体重下降明显(图 1B),活力不强,呈现出昏昏欲睡状态,呼吸困难,所有症状提示小鼠已发生了多器官功能不全综合征。器官病理切片显示小鼠的肝脏、肺脏及心脏都发生了明显的病理学改变。

小鼠各脏器组织切片经 HE 染色,显微镜下观察,肝脏、肺脏及心脏病理学改变结果如下。

3.1.1 肝脏组织病理学所见 主要病变为散在性点状或灶状肝细胞坏死,肝小叶内和汇管区密集或散在多发性淋巴细胞浸润灶,于上述病灶内及周围轻度枯否细胞和纤维细胞增生(图 2A),肝窦内数量不等的巨核细胞,伴变性(图 2B),上述病变于 11 例小鼠均见发生,程度基本相近。此外,尚见病灶内或周围轻度灶性出血(3 例),充血,蛋白性血栓形成(2 例)。

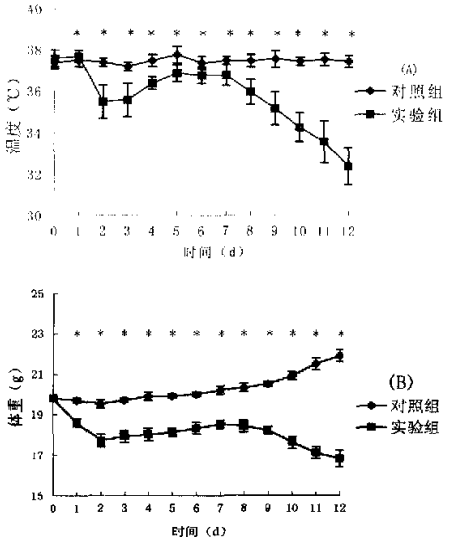


图 1 酵母多糖注射对照组及实验组小鼠体温(A)和体重(B)的变化,* 标记,$P<0.05$

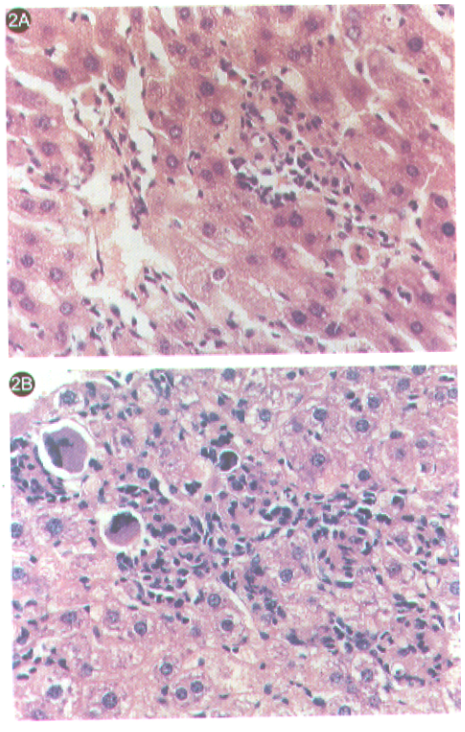


图 2 肝脏组织发生病理学改变(HE 染色,×500)

A. 肝小叶内淋巴细胞灶状浸润,肝细胞坏死,小叶间纤维细胞增生,枯否细胞增生;B. 肝窦内出现巨核细胞,伴变性

3.1.2 肺脏病理组织学所见 主要病变见 8 例肺脏

万方数据

弥漫性肺泡内出血，部分累及肺泡隔，伴水肿，于细小支气管腔内充塞数量不等的红细胞和蛋白性液体（图 3A）；2 例肺脏见小叶性出血，其中 1 例为个别小叶出血，另 1 例为多发性小叶性出血；另有 4 例肺脏见小叶性肺泡内水肿和肺泡隔增宽，充血，少量淋巴细胞和中性粒细胞浸润，呈小叶性肺炎性变化，该例肺膜下出血，间质增宽，并见肺膜局部间皮细胞脱落，缺损，周围间皮细胞空泡变性（图 3B）。

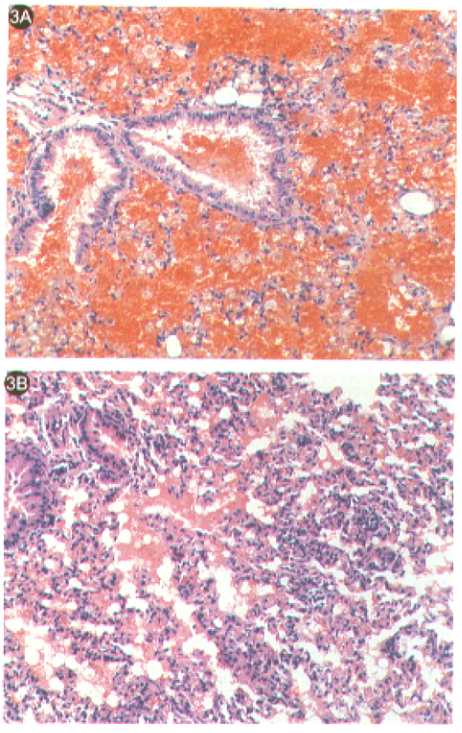


图 3 肺脏组织发生病理学改变（HE 染色，×250）

A. 肺泡腔弥漫性出血，累及到细支气管； B. 肺小叶性肺水肿，间质增宽，少量淋巴细胞浸润

3.1.3 心脏病理组织学所见 实验组小鼠心脏病变明显较肝脏和肺脏为轻。主要病变见局灶性心肌细胞变性。表现为心肌细胞萎缩变细，间隙增宽，胞核浓缩或固缩（图 4A），或表现为心肌细胞浊肿（图 4B），少数病例见心肌间质充血和灶状出血，淋巴细胞灶状浸润和内膜下传导纤维空泡变性。

以上病理学的观察表明，酵母多糖腹腔注射的确对小鼠的脏器产生损伤，其中以肝脏和肺脏最甚。同时，小鼠在生理学上的变化是与其脏器病理学上的变化相一致的。小鼠多个脏器受损，导致其发生多器官功能不全综合征，从而表现为活力低下，体重减轻，体温下降，呼吸困难乃至濒临死亡状态。

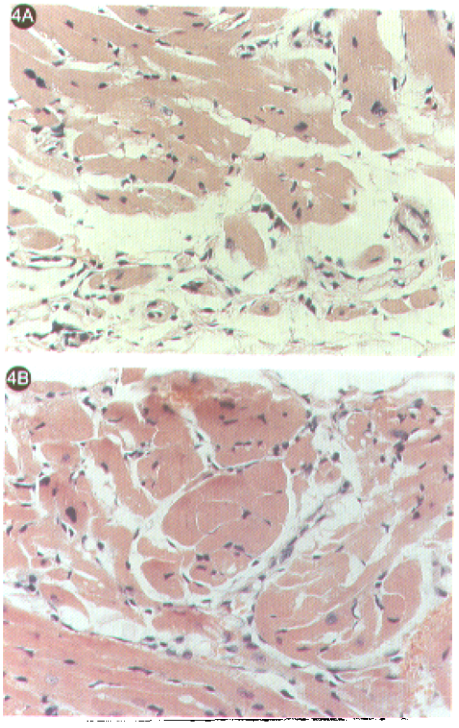


图 4 心脏组织发生病理学改变（HE 染色，×500）

A. 心肌细胞萎缩，胞核浓缩，细胞间隙增宽；B. 心肌细胞浊肿

3.2 MODS 小鼠脏器核提取物的 EMSA 结果 在酵母多糖诱导小鼠发生多器官功能不全过程中，巨噬细胞产生并释放大量细胞因子，这些因子均为 NF-κB 的激活剂。酵母多糖注射 12 d 后，处死小鼠，提取其心脏、肝脏和肺脏的细胞核蛋白，用 EMSA 法检测 NF-κB 在 MODS 小鼠模型脏器中的活性。放射自显影结果显示，在 MODS 小鼠脏器细胞核提取物中确有 NF-κB 转录因子与特异的寡核苷酸相结合（图 5），提示在 MODS 过程中，NF-κB 可能会启动一些与炎症有关的基因表达，加剧了脏器的炎症反应并最终导致其功能衰竭。

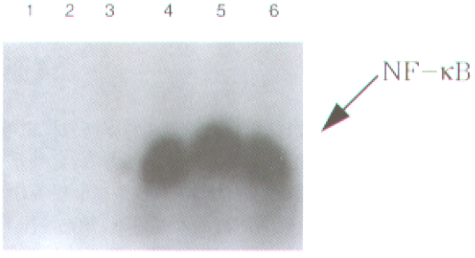


图 5 小鼠脏器细胞核提取物的 EMSA 结果

1，2，3为对照组小鼠的肝脏、肺脏和心脏；4，5，6为实验组小鼠的肝脏、肺脏和心脏

万方数据

4 讨 论

酵母多糖诱导小鼠发生三个阶段的生理变化，表现为体温、体重的波动以及活力的变化。自注射起0~2 d,小鼠表现为急性肠炎反应,食欲和活力下降并伴有腹泻,死亡率为21.4%;急性炎症反应过后,小鼠的活力有所上升,体重和体温有所恢复,但与正常小鼠的差异仍有显著性。至第8天,小鼠重新进入病态,进食很少,体重和体温下降,呼吸困难,昏昏欲睡。这些生理学上的变化提示小鼠已经发生了多器官功能不全综合征。对小鼠脏器进行病理学检测,结果表明,酵母多糖注射后的小鼠肝脏和肺脏发生了严重的炎症反应,同时,心脏组织也发生了病变,但不如肝脏和肺脏明显。这一结果提示,利用酵母多糖来制作的多器官功能不全模型对研究肝脏与肺脏衰竭是比较有利的。其他类似实验,也很少报道心脏病理学上的改变[5]。

酵母多糖可以激活多种细胞,包括巨噬细胞、中性粒细胞和自然杀伤细胞。酵母多糖与巨噬细胞之间的反应被认为是免疫反应起始的第一步[6]。巨噬细胞是一个具有多种生物功能的细胞,在宿主的防护系统中发挥重要作用。它不仅向淋巴细胞递呈抗原、消灭病菌,而且在炎症反应中分泌多种细胞因子,如白介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF)-α、和白介素-6(IL-6)等。研究表明,上述细胞因子均为NF-κB的激活因子[7]。当细胞处于静息状态时,NF-κB与其抑制因子IκB结合在一起处于无活性形式存在于细胞质中。当细胞受到某些因子的刺激时,IκB激酶被激活,IκB发生磷酸化,进而与泛素结合,被26S蛋白酶降解,游离的NF-κB在入核引导序列的作用下进入到细胞核中,与靶基因上游的特异DNA序列结合,启动靶基因的表达。巨噬细胞持续激活产生足够量的细胞因子,随血液和其他组织液进入到脏器中,激活脏器细胞中的NF-κB,启动表达大量的炎症分子,进而引发并加重MODS的症状。本文在酵母多糖引发MODS的小鼠模型脏器中检测到了具有活性的NF-κB。这一结果提示,NF-κB在MODS的发生与发展过程中起重要作用,可能是严重创伤与MODS的介导者;鉴定其在此过程中所调控的基因及蛋白可能对阐明MODS发生的机制及找到可行的防治途径具有重要意义,同时NF-κB也可能成为一个药物作用的靶点。

参 考 文 献

1 Deitch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. Ann Surg,1992,216:117-134.

2 Van Bebber IP, Lieners CF, Koldewijn EL, et al. Superoxide dismutase and catalase in an experimental model of multiple organ failure. J Surg Res,1992,52:265-270.

3 鲍国强,李素波,张永祥,等.小鼠脏器核转录因子NF-κB活性观察.中华老年多器官疾病杂志,2003,1:200-204.

4 Young SH, Ye J, Frazer DG, et al. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-α production in 1→3-β-glucan (zymosan)-activated macrophages. J Biol Chem, 2001, 276: 20781-20787.

5 Jansen MJ, Hendriks T, Vogels MT, et al. Inflammatory cytokines in an experimental model for the multiple organ dysfunction syndrome. Crit Care Med,1996,24:1196-1202.

6 Tapper H, Sundler R. Glucan receptor and zymosan-induced lysosomal enzyme secretion in macrophages. J Biochem, 1995,306:829-835.

7 Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-κB transcription factors. Oncogene,1999,18:6853-6866

(收稿日期:2003-04-24)

(本文编辑 张和起)

·消 息·

《亚临床肝癌》出版

《亚临床肝癌》由江正辉、黄志强、董家鸿教授主编,军事医学科学出版社出版,该书总结了本领域的新成就和新进展,是一部内容新颖、系统全面、有实用价值的专著,全书分4篇57章,86万余字,附140余幅彩色黑白照版。第一、二篇对亚临床肝癌的概念、病因、病理、现代影像及各类型肝癌等作了专章介绍。第三篇对亚临床肝癌的现代主要治疗手段如手切切除、射频消融、乙醇注射、再切除、高危人群监测,普查等作了详尽介绍。亚临床肝癌移植的远期疗效良好。第四篇共18章,详细介绍了肝移植各方面的治疗经验与随访观察结果。本书为精装本、设计精美。定价88元,由各新华书店等发行。邮购处:100850 北京市 海淀区太平路27号军事医学科学出版社。

万方数据