文章编号:1000-5404(2007)19-1859-04

论著

大鼠脑出血后脑肺组织 NF-κB 的表达及其在急性肺损伤中的作用

邹显巍,吴 珊 (贵阳医学院附属医院神经内科,贵阳 550004)

提 要: 目的 探讨 NF-κB 在脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)后在脑、肺组织的表达及在急性肺损伤(acute lung injury, ALI)中的作用。**方法** 采用自体血尾状核注入法制备脑出血大鼠模型。将 35 只大鼠随机分为假手术组(5只),脑出血组(30只),脑出血组又分为6、12、24、48 h和3、5 d 6个亚组。应用 HE 染色观察各组脑出血周围组织与肺组织的炎症反应情况。RT-PCR 法检测脑和肺组织中 NF-κB p65 mRNA 的表达。放射免疫法测定血清中 TNF-α 和 IL-1β 的含量。**结果** 脑出血后 12 h 脑水肿明显,24 h 血肿周围炎症细胞浸润增多,48 h 左右炎症反应最重;脑出血 6 h 即有间质性肺炎表现和局灶性肺气肿,48~72 h 炎症反应达高峰,肺泡结构破坏明显;与假手术组相比,NF-κB p65 mRNA 于脑出血 6 h 在脑血肿周围组织与肺组织中表达均开始增高($P<0.01$),48 h 均达高峰($P<0.01$),3~5 d 表达仍高于假手术组($P<0.01$);血清 TNF-α 含量在脑出血 6 h 开始增高($P<0.01$),48 h 最高($P<0.01$),5 d 时仍高于假手术组($P<0.01$);IL-1β 在脑出血各组中含量均无增高。**结论** 脑出血可以通过引发炎症反应导致急性肺损伤,NF-κB 在其病理生理学过程中起重要作用。

关键词: NF-κB; 脑出血; 急性肺损伤
中图法分类号: R563.9; R741.02; R743.34 **文献标识码**: A

Expression of NF-κB in the brain and lung and its role in acute lung injury following intracerebral hemorrhage of rats

ZOU Xian-wei, WU Shan (Department of Neurology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of NF-κB in acute lung injury following intracerebral hemorrhage. **Methods** Using stereotactic apparatus we infused autologous blood into the caudate nucleus to build up rat ICH model. A total of 35 male adult Wistar rats were randomly divided into sham-operation group($n=5$) and hemorrhage group($n=30$) that was subsequently divided into 6 subgroups (6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 3 d, and 5 d, $n=5$). The inflammatory reaction degrees in the peripheral tissues of hematoma in the brain and lung were observed after HE staining. The levels of NF-κB p65 mRNA in the brain and lung were assayed using RT-PCR. The content of TNF-α and IL-1β in serum was determined by radioimmunoassay (RIA) method. **Results** Brain edema was obvious at 12 h after intracerebral hemorrhage and the inflammatory cells infiltration increased at 24 h and reached maximum at 48 h in the peripheral tissues of hematoma. Interstitial pneumonia and local emphysema appeared at 6 h and got to peak at 48 – 72 h, in which alveolar structure was significantly destroyed. In comparison with sham-operation group, the expression of NF-κB p65 mRNA began to increase at 6 h in brain and lung tissues ($P<0.01$), and reached maximum at 48 h ($P<0.01$). Thereafter it began decreasing but was still higher at 5 d ($P<0.01$). The content of serum TNF-α began to increase at 6 h, got to peak at 48 h, and still higher than the sham-operation group at 5 d ($P<0.01$). The content of IL-1β did not increase among all intracerebral hemorrhage groups. **Conclusion** Intracerebral hemorrhage can induce acute lung injury through irritating the cascade of inflammation. NF-κB plays a critical role in the pathophysiology of inflammation.

Key words: nuclear factor-kappa B; intracerebral hemorrhage; acute lung injury

NF-κB 是普遍存在于细胞质中的一种快反应转录因子,与免疫反应、炎症反应、病毒感染、细胞周期调控以及肿瘤密切相关[1],参与了许多细胞因子及炎症介质基因的转录调控,在炎症反应的细胞因子网络环节中起重要作用。本研究通过构建脑出血诱导的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)大鼠模型,观察 NF-κB 在脑与肺中的表达规律,了解 NF-κB 在脑出血后 ALI 发

基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长基金(2006-58)
Supported by the Governor's Funds for Excellent Sci & Tech Teachers of Guizhou (2006-58)
作者简介:邹显巍(1974-),女,辽宁省大连市人,硕士研究生,医师,主要从事脑血管疾病方面的研究。电话:13765050570, E-mail: chinazxw002@163.com
通讯作者:吴 珊,电话:13312231575, E-mail: wuwushan@163.com
收稿日期:2006-12-26;修回日期:2007-05-10

病中的作用，为研究脑出血后 ALI 发病机制提供帮助。

1 材料与方法

1.1 动物分组

健康雄性 Wistar 大鼠，体质量 250～300 g。按随机数字表法分为假手术对照组（5 只）和脑出血组（30 只），脑出血组又分为 6、12、24、48 h 和 3、5 d 6 个亚组（每亚组 5 只）。

1.2 主要试剂和仪器

NF-κB p65 引物由上海生工合成，内参 β-actin 引物由上海鼎安生物合成；焦炭酸二乙酯（DEPC）购自瑞光生物公司；Trizol（上海生工）；cDNA 第 1 链合成试剂盒（Fermentas 公司）；*Taq* DNA 聚合酶（TaKaRa 公司）；DNA 标准（DL 2000）（TaKaRa 公司）；TNF-α 放免试剂盒（天津九鼎医学生物工程有限公司）；IL-1β 放免试剂盒（北京北方生物技术研究所）江湾Ⅰ型 C 脑立体定向仪；梯度 PCR 仪（德国 Eppendorf 公司）；紫外可见分光光度计（日本岛津公司）；凝胶成像分析系统（美国 Upland，CA91786）；γ-计数器（芬兰 WALLAC）。

1.3 方法

1.3.1 模型制作 参照 Xue 等[2]的方法制备大鼠脑出血模型。10% 水合氯醛按 300 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠，俯卧固定于立体定向仪上（前后囟位于同一水平），前囟前 0.5 mm、右侧旁开 3.0 mm；断尾取血，一次性 1 ml 注射器吸取新鲜血液约 70 μl，垂直向内进针 6 mm（相当于右尾状核部位）。5 min 内注入 50 μl 自体不凝血，留置 10 min 缓慢退针。假手术组不注血，余操作同脑出血组。分别于麻醉清醒后、每天上午，处死取标本前各评分 1 次。

实验性 ICH 大鼠出现不同程度的偏瘫症状及大鼠脑切片中有明显的圆形、椭圆形或不规则形的血肿存在。

1.3.2 标本及病理切片的制作 按规定的时间点取材 从大鼠左心室抽取 3 ml 全血制备血清（－20 ℃冻存备用）。剪开右心耳，0.9% 生理盐水注入右心室，充分灌洗肺组织，取肺标本；并迅速撬开颅骨，取完整脑组织，以针眼为中心，冠状位垂直切开，取血肿周围组织 100 g 左右投入液氮保作 RT-PCR 用，留取血肿周围 5 mm 厚冠状切片 4% 多聚甲醛固定 72 h 以上。固定好的标本进行常规脱水、透明和石蜡包埋，制成 5 μm 的切片。

1.3.3 病理观察 常规 HE 染色，光镜下观察。

1.3.4 放射免疫法测定血清 TNF-α 含量 操作过程严格按照说明书进行。

1.3.5 RT-PCR 检测 NF-κB p65 mRNA 水平 按如下步骤进行：①脑血肿周围组织及肺组织总 RNA 的提取；②紫外分光光度计对 RNA 定量及纯度鉴定［要求纯化至 $D(260)/D(280)>1.8$，RNA（g/L）$=D(260)\times40\times$稀释倍数/1 000］；③以 Oligo（dT）为引物，M-MuLV 逆转录酶催化合成 cDNA 第 1 链；④NF-κB p65 引物设计参考文献[3]，正义链：5′- AAGATCAATGGCTACACAGG-3′，反义链：5′-CCTCAATGTCTTCTTTCTGC-3′（based on MEDLINE derived sequence，accession no. M61909。产物长度 493 bp，Tm：55. 75 ℃）；β-actin 正义链：5′-GTAGCCATCCAGGCTGTGTT-3′，反义链：5′-CAGTGAGGCCAGGATAGAGC-3′（NM031144 GI：42475962，产物长度 648 bp，Tm：62.5 ℃）；⑤NF-κB p65 PCR 循环条件 95 ℃ 4.5 min→94 ℃ 1 min→55 ℃ 1 min→ 72 ℃ 1 min 30 个循环，最后 72 ℃延伸 7 min；内参 β-actin PCR 循环条件：94 ℃ 3 min →94 ℃ 30 s→56 ℃ 45 s→72 ℃ 45 s 30 个循环，最后 72 ℃ 延伸 7 min；⑥1.5% 琼脂糖凝胶电泳；⑦凝胶成像系统成像；⑧积分吸光度测定及半定量分析：NF-κB p65 PCR 产物相对量 = PCR 产物电泳条带面积积分的光密度/β-actin 电泳条带面积积分的光密度。用美国 Bio-Rad 公司的 Quantity One V4.5 软件进行分析。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析，两两比较采用 q 检验。

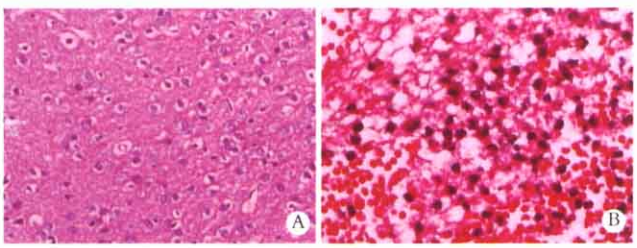
2 结果

2.1 大鼠行为学评分结果

应用 Longa 评分法对每只大鼠进行评分，假手术组麻醉清醒后即恢复正常，评分 0 分；脑出血各组大鼠存在不同程度行为学异常，与假手术组比较差异显著（$P<0.05$）；脑出血各组间评分结果无明显差异（$P>0.05$）。

2.2 病理结果

HE 染色光镜下观察脑组织：假手术组无明显的病理改变，基质无明显水肿，神经元形态结构正常，无炎症细胞浸润，无胶质细胞增生（图 1A）。脑出血组各时间点均见明确的脑血肿，5 d组脑血肿有所吸收，血肿周围脑组织疏松；6 h 可见轻度的脑水肿，少量神经元出现肿胀变性坏死；12 h 脑水肿明显，血肿内可见裂解的细胞核，血肿周围可见少量的中性粒细胞和淋巴细胞浸润；24 h 炎症细胞浸润增多，胶质细胞开始明显增生，神经元变性坏死增多；48 h 脑水肿及炎症反应最重，中性粒细胞、淋巴细胞浸润达明显，巨噬细胞浸润开始增多（图 1B），持续至 5 d 时仍明显，大量神经元变性坏死。3 d 后脑水肿减轻，中性粒细胞浸润减少，3～5 d 时胶质细胞增生仍明显。

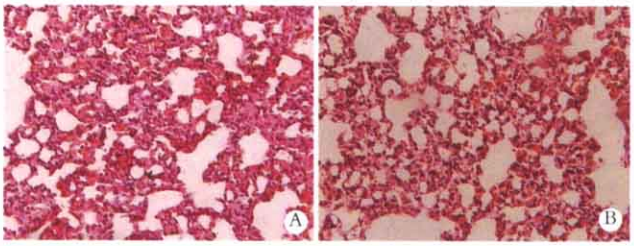


A：假手术组；B：脑出血 48 h 组

图 1 脑组织病理变化 （HE×200）

HE 染色光镜下观察肺组织：假手术组大鼠肺组织结构完整，肺泡腔清晰，肺泡间隔无水肿、炎症等特殊改变。脑出血组各时相点均出现毛细血管扩增充血，支气管黏膜变性，坏死脱落，6 h 开始即有间质性肺炎的表现，有局灶性肺气肿，肺泡间质有少量中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞等炎症细胞浸润，肺泡腔内可见浆液性渗出，随时间延长炎症反应逐渐加重，48 h至 3 d 炎症反应最重，肺泡结构破坏明显，部分肺泡塌陷萎缩，可见肺出血，中性粒细胞浸润明显增多；3 d 后中性粒细胞

浸润逐渐减少，巨噬细胞浸润增多（图 2）。病理形态证实脑出血后急性肺损伤模型建立成功。



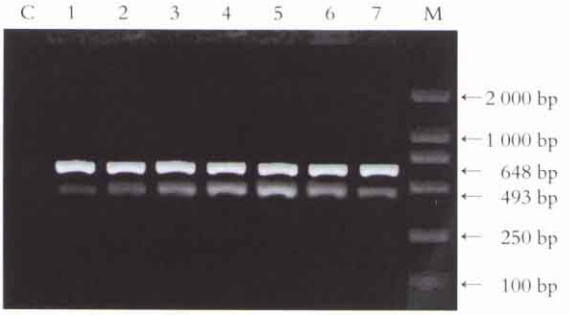
A：脑出血 48 h 组；B：脑出血 3 d 组

图 2　肺组织病理变化　（HE×200）

2.3　RT-PCR 结果

2.3.1　ICH 后血肿周围脑组织 NF-κB p65 mRNA 的表达

各时相点 NF-κB p65 mRNA 在脑血肿周围的表达见图 3。PCR 产物相对量的统计结果表明：脑出血 6 h 血肿周围组织即可见 NF-κB p65 mRNA 的表达增高（0.22 ± 0.04），与假手术组（0.10 ± 0.05）比较差异显著（$P<0.01$），逐渐增高；48 h 表达达高峰（0.76 ± 0.10），与脑出血各时相点比较差异有统计学意义（$P<0.05$）；3 d 后表达（0.52 ± 0.06）开始下降，但 5 d 时（0.29 ± 0.05）表达仍高于假手术组（$P<0.01$）。



M：DNA 标准（DL 2000）；C：阴性对照；1：假手术组；2：6 h 组；3：12 h 组；4：24 h 组；5：48 h；6：3 d 组；7：5 d 组

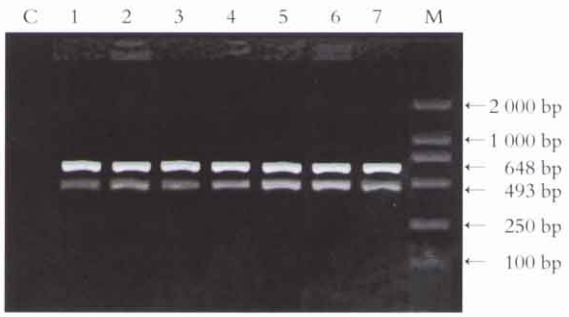
图 3　NF-κB mRNA 在各组脑组织中的表达

2.3.2　ICH 后肺组织 NF-κB p65 mRNA 的表达规律

各时相点 NF-κB p65 mRNA 在肺组织的表达见图 4。统计结果表明脑出血后 6 h NF-κB p65 mRNA 在肺组织表达增高（0.26 ± 0.04）与假手术组（0.11 ± 0.04）比较差异显著（$P<0.01$）；48 h 表达最高（0.86 ± 0.08），与假手术组比较差异显著（$P<0.01$），与脑出血各时相点比较 q 检验差异有统计学意义（$P<0.05$），3 d 后表达开始下降（0.53 ± 0.06），但 5 d 时表达（0.35 ± 0.09）仍高于假手术组（$P<0.01$）。与在脑血肿周围组织中的变化规律一致。

2.4　放射免疫法测定结果

脑出血后 6 h 血清中 TNF-α 含量在 48 h 达高峰点，3 d 后有下降趋势，脑出血组各时相点均高于假手术组（$P<0.01$）（表 1）。6、12、24、48 h 之间两两比较均有显著性差异（$P<0.01$）；3 d 组与 5 d 组比较无差异（$P>0.05$）。脑出血各组血清 IL-1β 含量与假手术组比较无统计学意义（$P>0.05$），脑出血各组之间比较亦无差别（$P>0.05$）；提示脑出血后血清 IL-1β 含量无增高（表 1）。



M：DNA 标准（DL 2000）；C：阴性对照；1：假手术组；2：6 h 组；3：12 h 组；4：24 h 组；5：48 h；6：3 d 组；7：5 d 组

图 4　NF-κB p65 mRNA 在各组肺组织中的表达

表 1　各组血清中 TNF-α 及 IL-1β 含量变化（ng/ml，$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

组别	TNF-α	IL-1β
假手术组	0.96 ± 0.06	0.09 ± 0.00
脑出血组		
6 h	1.54 ± 0.14[a]	0.09 ± 0.00
12 h	2.10 ± 0.16[ab]	0.09 ± 0.00
24 h	2.56 ± 0.25[abc]	0.10 ± 0.00
48 h	5.05 ± 0.16[abcd]	0.09 ± 0.00
3 d	3.16 ± 0.13[abcde]	0.10 ± 0.00
5 d	2.97 ± 0.09[abcde]	0.10 ± 0.00

a：$P<0.01$，与假手术组比较；b：$P<0.05$，与 6 h 组比较；c：$P<0.05$，与 12 h 组比较；d：$P<0.05$，与 24 h 组比较；e：$P<0.05$，与 48 h 组比较

3　讨论

急性肺损伤（acute lung injury，ALI）和急性呼吸窘迫综合征（acute respiratory distress syndrome，ARDS）是脑出血后出现最早，发生率也最高的并发症[4]。脑出血后肺损伤的机制相当复杂，可能涉及多方面因素包括血脑屏障的破坏、脑脊液普遍性改变和低氧血症[5]。传统的观点强调了神经-内分泌系统的作用：即脑出血后颅内压突然升高致使下丘脑功能紊乱，下丘脑-垂体-肾上腺皮质（HPA）轴激活，交感神经兴奋，肾上腺皮质激素，儿茶酚胺等应激激素大量释放导致周围血管强烈收缩，血流阻力增加，使大量血液从高阻力的体循环转移至低阻力的肺循环，从而引起急性肺水肿。在神经内分泌反应的同时，血清补体以及中性粒细胞，单核-巨噬细胞、淋巴细胞等免疫细胞也处于活化状态，并释放出大量炎症介质，引起全身炎症反应和急性肺损伤。NF-κB 在 ALI 的炎症介质网络调控中起中心环节作用[6]。

当多种刺激因子，如内毒素、TNF-α、IL-1 等与细胞上不同的受体结合后，使 NF-κB 诱导激酶（NIK）激活，活化的 NIK 进一步激活 IκB 激酶（IKKα 和 IKKβ）。活化的 IKKα 和 IKKβ 使 IκBα、IκBβ 迅速磷

酸化和泛素化，然后被蛋白酶小体降解，NF-κB 核定位信号暴露从而发生核转移。多种基因的启动子和增强子序列中均含有功能性 NF-κB 的结合序列，活化的 NF-κB 与 DNA 链上特定的 κB 序列结合后，即可启动和调节众多与免疫及炎症反应有关的基因转录。因此认为 NF-κB 在启动、放大和延续肺部炎症反应过程中起着中枢性调节作用，参与了急性肺损伤的发生发展过程[7]。

本实验建立大鼠自体血注入脑尾状核出血模型，注入 50 μl 血相当于人类 40 ml 中等量的出血。病理观察结果表明脑出血后血肿周围组织存在明显的炎症反应，包括中性粒细胞等炎症细胞浸润，胶质细胞不同程度的增生，同时伴有肺组织的炎症性损伤：ICH 后 6 h即有间质性肺炎的表现，局灶性肺气肿，肺泡间质炎症细胞浸润，肺泡腔内可见浆液性渗出，48 h 炎症反应达高峰。本实验从病理形态证实脑出血可继发急性肺损伤。

研究表明，在 LPS 或休克诱导的急性肺损伤动物模型中鼠气道和肺组织内的 NF-κB 的表达增加，NF-κB 被激活的同时，伴有 IL-1β、TNF-α 及 TGF-β1 等细胞因子 mRNA 表达增高，且这些 mRNA 表达是受 NF-κB 控制的[8]。NF-κB 的持续活化与肺损伤的严重程度有关，阻断 NF-κB 途径对即使已发生的肺部炎症也是有利的[9]。

本实验在脑出血诱导的急性肺损伤模型中显示，NF-κB p65 mRNA 在 ICH 后 6 h 血肿周围脑组织中表达增高，48 h 达高峰。结果提示 NF-κB p65 mRNA 在脑出血后肺组织中广泛表达，且与肺部炎症损害程度密切相关。肺中 NF-κB p65 mRNA 在 ICH 后 48 h 表达最高，而此时肺中中性粒细胞浸润及炎症损害最重，同时伴有血清 TNF-α 含量明显增高，故推测 NF-κB 在脑出血后诱导的急性肺损伤炎症过程中发挥重要作用。

本实验中脑出血各组血清 IL-1β 含量均无增高，有趣的是 Wu 等[10]用 Western blot 法检测 IL-1β 的表达，发现在脑出血后 6～24 h IL-1β 在脑中表达增高，肺中 IL-1β 水平短暂升高后迅速恢复至正常水平。所以 IL-1β 在脑出血后肺损伤中的作用仍需进一步证实。

但 NF-κB 通过何种途径介导急性肺损伤？炎症通路在哪里？从本研究结果我们推测脑出血激活脑组织中 NF-κB，激活的 NF-κB 导致 TNF-α 等细胞因子的表达增高，细胞因子等炎性介质可通过破坏的血脑屏障进入血液循环[11]，到达肺组织，激活肺组织和肺泡巨噬细胞的 NF-κB，而活化的 NF-κB 又可导致细胞因子，趋化因子基因表达增高，肺泡内中性粒细胞浸润增多，肺血管内皮细胞和肺泡上皮细胞广泛损伤，从而导致急性肺损伤。而 TNF-α 等细胞因子对 NF-κB 的表达起正反馈调节作用，从而使炎症信号不断放大引起失控性炎症反应。我们推测血液可能是脑出血后 ALI 的炎性通路，但需要严格的实验论证。

本实验尚不能回答细胞因子网络介导的全身炎症反应是否作为独立途径导致脑出血后的急性肺损伤，但可以证实炎症反应是脑出血后 ALI 的重要机制，NF-κB 在此病理生理机制中起关键作用。由于 NF-κB 涉及与炎症有关多个基因转录的启动调控，因此它有望成为防治脑出血后全身炎症反应综合征与 ALI 的重要靶点之一。

（致谢：感谢本院细胞生物学教研室苏晓庆教授的大力支持，感谢冯维龙提供肺组织图片！）

参考文献：

[1] Senftleben U, Karin M. The IKK/NF-kappa B pathway[J]. Crit Care Med, 2002, 30(1 Suppl): S18－S26.

[2] Xue M, Del-Bigio M R. Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: time course of inflammation and cell death[J]. Neurosci Lett, 2000, 283(3): 230－232.

[3] Vollgraf U, Wegner M, Richter-Landsberg C. Activation of AP-1 and nuclear factor-kappaB transcription factors is involved in hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death of oligodendrocytes[J]. J Neurochem, 1999, 73(6): 2501－2509.

[4] Estenssoro E, Dubin A, Laffaire E, *et al*. Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome[J]. Crit Care Med, 2002, 30(11): 2450－2456.

[5] Earle S A, Proctor K G, Patel M B, *et al*. Ubiquitin reduces fluid shifts after traumatic brain injury[J]. Surgery, 2005, 138(3): 431－438.

[6] Aqhai Z H, Kumar S, Farhath S, *et al*. Dexamethasone suppresses expression of Nuclear Factor-kappaB in the cells of tracheobronchial lavage fluid in premature neonates with respiratory distress[J]. Pediatr Res, 2006, 59(6): 811－815.

[7] Yum H K, Arcaroli J, Kupfner J, *et al*. Involvement of phosphoinositide 3-kinases in neutrophil activation and the development of acute lung injury[J]. J Immunol, 2001, 167(11): 6601－6608.

[8] Walley K R, McDonald T E, Higashimoto Y, *et al*. Modulation of proinflammatory cytokines by nitric oxide in murine acute lung injury[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160(2): 698－704.

[9] Everhart M B, Han W, Sherrill T P, *et al*. Duration and intensity of NF-kappaB activity determine the severity of endotoxin-induced acute lung injury[J]. J Immunol, 2006, 176(8): 4995－5005.

[10] Wu S, Fang C X, Kim J, *et al*. Enhanced pulmonary inflammation following experimental intracerebral hemorrhage[J]. Exp Neurol, 2006, 200(1): 245－249.

[11] Lampl Y, Shmuilovich O, Lockman J, *et al*. Prognostic significance of blood brain barrier permeability in acute hemorrhagic stroke[J]. Cerebrovasc Dis, 2005, 20(6): 433－437.

（编辑 郭建秀）