论著

文章编号:1000-5404(2008)15-1430-04

慢性肾衰竭大鼠主动脉 NF-κB 的表达变化

冯 兵,杨 旭,叶自林,袁发焕,杨惠标,张耀全 (第三军医大学新桥医院肾内科,全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨尿毒症时主动脉局部炎症信号 NF-κB 表达变化。方法 采用单肾切除、对侧肾动脉部分结扎法建立慢性肾衰竭模型,RT-PCR 检测 NF-κB p65 亚基、I-κB mRNA 表达水平,免疫组织化学检测 p65 亚基蛋白表达,凝胶迁移率法测定 NF-κB 活性,并用图像分析定量。结果 与正常大鼠比较,慢性肾衰竭大鼠主动脉 NF-κB p65 亚基 mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$),而 I-κB mRNA 表达水平显著降低($P<0.01$),NF-κB p65 亚基蛋白表达和活性也显著增加($P<0.01$),并随病程延长而进一步上升。蛋白酶体抑制剂 MG-132 可明显抑制慢性肾衰竭大鼠主动脉 NF-κB 组分表达和活性升高。结论 慢性肾衰竭大鼠主动脉 NF-κB 炎症信号通路存在显著活化。

关键词:慢性肾功能衰竭;主动脉;NF-κB
中图法分类号:R322.121;R392.13;R692.5 文献标识码:A

Expression changes of NF-κB in aorta of rats with chronic renal failure

FENG Bing, YANG Xu, YE Zi-lin, YUAN Fa-huan, YANG Hui-biao, ZHANG Yao-quan (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the alteration of inflammatory signal (NF-κB) in aorta of rats with chronic renal failure. Methods The animal model was established by partial ligation of renal pedical artery and other side nephrectomy. The mRNA expression of NF-κB and I-κB were detected by RT-PCR, the protein expression of NF-κB was measured by immunohistochemistry, and the activity of NF-κB was examed by electrophoresis mobility shift assay (EMSA). Results Significant increase of the mRNA expression of NF-κB p65 was found in experimental group than in control group ($P<0.01$), while marked decrease of the mRNA expression of I-κB was noted ($P<0.01$). The protein expression and activity of NF-κB was also increased significantly ($P<0.01$), and it is further increased in the course of renal failure progress. The expression and activity of NF-κB was inhibited significantly by MG-132 treatment. Conclusion The inflammatory signal of NF-κB is activated in the pathogenesis of chronic renal failure of rats.

Key words: chronic renal failure; aorta; NF-κB

尿毒症患者动脉粥样硬化发病率显著高于同年龄正常人,推测可能与尿毒症时微炎症反应有关[1,2]。但是,对于尿毒症时主动脉局部炎症反应情况和动态变化,以及是否与循环微炎症反应相关等尚不清楚。许多研究表明,泛素蛋白酶体是调节体内废用蛋白降解的主要途径,它的功能异常(功能低下或过度活化)与炎症活化等多种生理机能失调有关[3-5]。NF-κB 转录调节多种细胞因子和炎症介质,被认为是炎症级联反应的中心靶点,它的激活直接由泛素蛋白酶体信号通路(ubiquitin proteasome pathway, UPP)所调节[6]。因此,本实验以蛋白酶体抑制剂 MG-132 作为干预试剂,拟探讨尿毒症大鼠主动脉 NF-κB 组分的表达变化。

1 材料与方法

1.1 慢性肾衰竭动物模型的建立

选择 SPF 级健康雄性 2 月龄 Wistar 大鼠(第三军医大学实验动物中心提供)50 只,体质量(220±250)g,分笼饲养,自由食水,适应生活环境 1 周。术前禁食 12 h。慢性肾功能衰竭大鼠模型参照文献[7]进行,主要步骤:腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 45 mg/kg 麻醉后,将大鼠仰卧固定在手术台上,碘酒乙醇消毒腹部,于剑突下 1 cm 取腹正中切口,切开约 2 cm,找出左肾,结扎左肾动脉上下 2 个分支,找出右肾,结扎肾蒂,切除右肾,逐

基金项目:国家自然科学基金(30570763)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570763)
作者简介:冯 兵,男,四川省射洪县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事糖尿病肾病及尿毒症相关心血管并发症发病机制方面的研究,发表论文 40 余篇。E-mail:fxb12@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-08-30 修回日期:2007-12-10

层缝合腹部切口,对照组取腹正中切口后,找到左右肾脏,牵拉被膜,逐层缝合切口。实验分组:按随机数字法将动物分为单纯肾衰模型组(CRF,20 只)、肾衰模型 + MG-132 干预组(CRF + M,20 只)和假手术组(Con,10 只)。各组大鼠自由食水,治疗组术后开始给予腹腔注射 MG-132 10 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,持续 4 ~ 6 个月。各组大鼠取血后,分离主动脉组织,去除外膜后一部分液氮保存供 mRNA 表达水平和 NF-κB 活性测定,一部分于 10% 甲醛溶液固定,用于免疫组织化学染色。

1.2　肾功能测定

采用酶法测定血清肌酐(上海篮一生物有限公司)、尿素氮(宗申德控生物有限公司)含量。

1.3　主动脉 NF-κB 亚基 p65 和 I-κB mRNA 表达的测定

采用绵阳天泽基因工程有限公司的 RNA Out 试剂盒,用一步法提取细胞总 RNA。提取的总 RNA 经电泳鉴定未被降解,用 DU800 核酸/蛋白检测仪测 RNA 在 260 nm 和 280 nm 波长的紫外光下的吸光度值,所有样品的 $D(260)/D(280)$ 值均介于 1.9 ~ 2.1。并根据 $D(260)$ 的值对样品的总 RNA 进行初步定量。采用 TaKaRa 逆转录试剂盒把各组 RNA 合成 cDNA。然后分别进行 cDNA 的 PCR 扩增,引物见表 1。PCR 反应体系先在 94 ℃预变性 4 min,然后进行 PCR 反应,反应条件:94 ℃变性 50 s,相应温度退火 50 s,72 ℃延伸 1 min,40 个循环。所用引物见表 1。取 PCR 扩增产物 5 μl,在加了溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶电泳板上电泳,凝胶成像分析系统对结果成像、条带密度扫描,以 GAPDH 为内参照,测定每个样品的 p65 和 I-κB mRNA 表达水平的相对量变化。

表 1　所有基因引物表

基因	引物序列
NF-κB(781 bp)	上游引物 5′-ACGACCAAGCCAGGGAGGTGAAG-3′
	下游引物 5′-GGCCCAAGTGACCCGCATAGTGT-3′
I-κB(326 bp)	上游引物 5′-TGGAGCCGACCTCAATAAACC-3′
	下游引物 5′-TGCGACTGTGAACCACGATG-3′
GAPDH(289 bp)	上游引物 5′-TGCTGAGTATGTCGTGGAGT-3′
	下游引物 5′-AGTCTTCTGAGTGGCAGTGAT-3′
GAPDH(439 bp)	上游引物 5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′
	下游引物 5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′

1.4　p65 亚基蛋白表达水平及分布

采用 ABC 免疫组织化学染色试剂盒(购自北京中杉公司),根据试剂盒提供的操作说明进行。分别将各组大鼠动脉组织的石蜡切片常规脱蜡至水,置 0.1 mol/L 的枸橼酸钠溶液中进行微波抗原修复,滴加 3% 去离子 H_2O_2 去除内源性过氧化物酶活性,滴加山羊血清封闭,分别滴加抗大鼠 NF-κB p65(1∶100)(购自武汉博士德公司)4 ℃过夜。次日,PBS 漂洗后加入生物素标记的二抗,37 ℃孵育 15 min,PBS 漂洗后经辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液 37 ℃孵育15 min,PBS 漂洗后加 DAB 显色,再以苏木精复染,常规脱水透明,中性树脂封片,在普通光学显微镜下观察结果。图像经 Leica Qwin 软件对于阳性区域的百分比进行分析计算。

1.5　NF-κB 活性的测定

参照文献[7]进行,整个过程分 3 步:①细胞核蛋白的提取。②NF-κB 探针标记。③EMSA 电泳。抗 P65 多克隆抗体(兔抗鼠)购自美国 Santa Cruz 公司,T_4 多核苷酸激酶和 NF-κB 探针购自美国 Promega 公司,探针序列为:5′-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3′;5′-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3′。反应样本经 4% 非解离聚丙烯酰胺凝胶电泳约 2 h(150 V),晾干凝胶,置 -70 ℃放射自显影。结果以图像分析系统进行测量积分灰度值。

1.6　统计学处理

数据 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 S-N-K 独立样本 t 检验。

2　结果

2.1　慢性肾衰竭大鼠血清肌酐、尿素氮的变化

结果显示,与假手术(Con)组比较,肾衰模型(CRF)组大鼠肌酐显著升高,随着时间延长,6 个月较 4 个月时进一步明显升高($P < 0.01$)。CRF 组大鼠的尿素氮升高相对较慢较晚,仅 6 个月时大鼠血尿素氮浓度显著高于 Con 组(表 2)。CRF 大鼠肾脏病理显示,肾小球明显硬化特征(系膜增厚、小球细胞减少、小球体积缩小)、间质纤维化、炎性细胞浸润及肾小管细胞萎缩。

表 2　慢性肾衰大鼠肾功能的变化及 MG-132 治疗的影响($\bar{x} \pm s$)

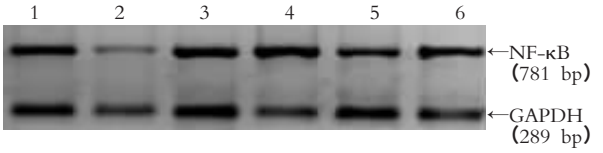
组别	肌酐(μmol/L)		尿素氮(mmol/L)	
	术后 4 个月	术后 6 个月	术后 4 个月	术后 6 个月
假手术组	33.20 ± 2.49	32.80 ± 2.28	6.40 ± 0.92	6.74 ± 0.63
肾衰模型组	55.80 ± 5.49	112.40 ± 11.30[a]	10.25 ± 1.03	15.72 ± 2.54[a]

a:$P < 0.01$,与假手术组比较

2.2　主动脉 NF-κB 亚基 p65 和 I-κB mRNA 表达的变化及 MG-132 治疗的影响

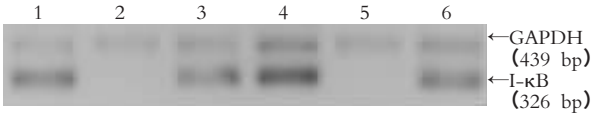
本实验结果表明,与 Con 组比较[术后 4 个月(2.294 ± 0.249),术后 6 个月(2.228 ± 0.209)],CRF 组大鼠主动脉 NF-κB mRNA 表达水平均显著升高($P < 0.05$),随着时间延长,6 个月时 NF-κB mRNA 的表达(3.238 ± 0.415)较 4 个月时(3.166 ± 0.170)进一步升高,但未见显著性差异($P > 0.05$);与 CRF 组比较,CRF + M 组主动脉 NF-κB 的 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$),6 个月时 NF-κB mRNA 的表达(1.564 ± 0.309)比 4 个月时表达量(1.704 ± 0.254)更低,但无显著性差异($P > 0.05$)。而 NF-κB 的抑制因子 I-κB 则表现出与 NF-κB 相反的趋势:即与 Con 组比较[术后 4 个月(1.138 ± 0.114),术后 6 个月(1.094 ± 0.070)],CRF 组大鼠主动脉 I-κB mRNA 表达水平均显著降低($P < 0.05$),随着时间延长,6 个月时 I-κB mRNA 的表达(0.818 ± 0.131)较 4 个月时(0.836 ± 0.079)进一步降低,但无显著性差异($P > 0.05$);与 CRF 组比较,CRF + M 组主动脉 I-κB mRNA 表达水平显著升高($P < 0.01$),6 个月时 I-κB mRNA 的表达(1.484 ± 0.148)比 4 个月时表达(1.460 ± 0.212)进一步升高,但无显著性差异($P > 0.05$)。MG-132 治疗可显著抑制手术后大鼠主动脉 NF-κB mRNA 表达,即 CRF +

M 组大鼠主动脉 NF-κB mRNA 表达水平显著低于 CRF 组，而 I-κB mRNA 表达水平显著高于 CRF 组，与 Con 组比较无显著性差异（$P>0.05$）（图 1、2）。



1：CRF 组（4 个月）；2：CRF + M 组（4 个月）；3：Con 组（4 个月）；4：CRF 组（6 个月）；5：CRF + M 组（6 个月）；6：Con 组（6 个月）

图 1　各组大鼠动脉 NF-κB mRNA 的表达变化

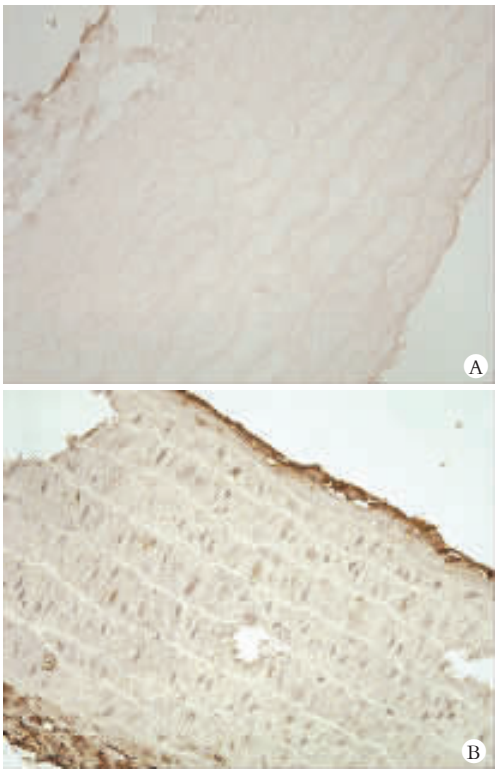


1：CRF + M 组（4 个月）；2：CRF 组（4 个月）；3：Con 组（4 个月）；4：CRF + M 组（6 个月）；5：CRF 组（6 个月）；6：Con 组（6 个月）

图 2　各组大鼠动脉 I-κB mRNA 的表达变化

2.3　主动脉 NF-κB 亚基 p65 蛋白表达的定位检测

结果表明，与 Con 组比较［术后 4 个月（3.22 ± 0.18）%，术后 6 个月（3.34 ± 0.22）%］，CRF 组大鼠主动脉 NF-κB 亚基 p65 蛋白表达的阳性面积水平均显著升高，随着时间延长，6 个月时［（14.83 ± 1.55）%］较 4 个月时［（12.08 ± 1.51）%］NF-κB进一步升高（$P<0.01$）。与 CRF 组相比，CRF + M 组主动脉 NF-κB 的阳性面积水平显著降低［术后 4 个月（3.52 ± 0.25）%、术后 6 个月（3.45 ± 0.26）%，$P<0.01$］，见图 3。

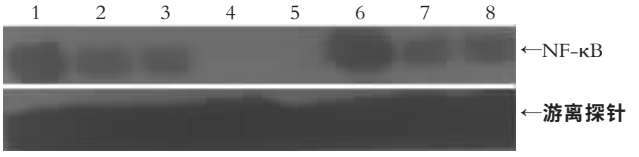


A：Con 组　B：CRF 组

图 3　慢性肾衰竭大鼠主动脉 NF-κB 蛋白表达　（ABC × 400）

2.4　主动脉 NF-κB 活性的变化及 MG-132 治疗的影响

结果表明，与 Con 组［术后 4 个月（0.67 ± 0.29），术后 6 个月（0.56 ± 0.18）］比较，CRF 组大鼠主动脉 NF-κB 活性显著升高，随着时间延长，6 个月时［（3.17 ± 0.53）］较 4 个月时［（1.22 ± 0.17）］NF-κB 进一步升高（$P<0.01$）。与 CRF 组相比，CRF + M 组主动脉 NF-κB 活性水平显著降低［术后 4 个月（0.63 ± 0.17），术后 6 个月（0.83 ± 0.35），$P<0.05$］。见图 4。



1：CRF 组（4 个月）；2：CRF + M 组（4 个月）；3：Con 组（4 个月）；4：空白对照；5：竞争抑制；6：CRF 组（6 个月）；7：CRF + M 组（6 个月）；8：Con 组（6 个月）

图 4　慢性肾衰竭大鼠主动脉 NF-κB 活化情况

3　讨论

大量研究结果表明[8]，NF-κB 活化是炎症反应激活的共同信号通路，是启动和控制炎症反应的中枢环节。诱导 NF-κB 活化的主要信号通路主要是泛素蛋白酶体降解 NF-κB 的抑制蛋白 I-κB，游离的 NF-κB 具有向细胞核内移位的能力，进入细胞核内的 NF-κB 与各种炎症介质和细胞因子靶基因启动子区域的特定序列结合而迅速诱导相应基因的表达，从而启动细胞炎症反应。如果主动脉内皮细胞和平滑肌细胞炎症信号 NF-κB 活化，将导致主动脉粥样硬化病变[9,10]。

本研究参照 Alevy 等[11] 报道的方法建立慢性肾衰竭大鼠模型，从肾功能和肾脏病理检查结果均证实肾衰竭模型是成功的。本研究结果表明，在慢性肾衰竭大鼠主动脉 NF-κB/IKK 系统组分 NF-κB mRNA 的表达显著增加，而 NF-κB 的抑制分子 I-κB mRNA 的表达却显著降低，且二者的变化随慢性肾衰病程延长更明显。在蛋白表达水平上，本研究经免疫组织化学方法对各组大鼠的主动脉进行定位和定量测定结果显示，慢性肾衰大鼠主动脉 NF-κB 的阳性表达均显著高于对照组，主要是内膜细胞和肌层细胞的阳性表达，这些部位正是动脉粥样硬化发生的启动环节。EMSA 方法检测发现，与对照组大鼠比较，慢性肾衰大鼠主动脉 NF-κB 的 DNA 结合活性也显著增加。这些结果充分提示慢性肾衰大鼠主动脉壁细胞内炎症信号通路明显活化，这被认为是引起内皮细胞功能异常、平滑肌细胞泡沫化的前提[10,11]。

本研究结果表明，应用蛋白酶体抑制剂治疗后，慢性肾功能衰竭大鼠主动脉组织 NF-κB mRNA 和蛋白表达均显著减少，使 NF-κB 活性显著降低，这些结果进一步支持慢性肾衰竭大鼠主动脉组织 NF-κB 存在显著活化，同时提示，若以 UPP 作为药物靶点可有效

抑制慢性肾衰竭大鼠主动脉组织的炎症活化。

参考文献：

[1] 叶云洁，倪兆慧，钱家麒，等. 终末期肾病微炎症状态和动脉粥样硬化的关系[J]. 中华肾脏病杂志，2004，20(3)：173－176.
[2] Kaysen G A. The microinflammatory state in uremia：causes and potential consequences[J]. J Am Soc Nephrol，2001，12(7)：1549－1557.
[3] Zolk O，Schenke C，Sarikas A. The ubiquitin-proteasome system：focus on the heart[J]. Cardiovasc Res，2006，70(3)：410－421.
[4] Sluijter J P，de-Kleijn D P，Pasterkamp G. Vascular remodeling and protease inhibition--bench to bedside[J]. Cardiovasc Res，2006，69(3)：595－603.
[5] Eliott P J，Zollner T M，Boehncke W H. Proteasome inhibition：a new anti-inflammatory strategy[J]. J Mol Med，2003，81(4)：235－245.
[6] Sigal L H. Basic science for the clinician 39：NF-kappaB-function，activation，control，and consequences[J]. J Clin Rheumatol，2006，12(4)：207－211.
[7] 杨光伦，姚榛祥，黄 平，等. NF-κB P65 在大鼠异种心脏移植后心肌中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报，2007，29(1)：51－52.
[8] 徐 智，吴国明，钱桂生，等. 缺氧条件下大鼠单核细胞 NF-κB 活性及 TNFα、IL-1β 表达变化规律的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(8)：746－749.
[9] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease[J]. N Engl J Med，1999，340(2)：115－126.
[10] Kempe S，Kestler H，Lasar A，*et al*. NF-kappaB controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells：evidence for the regulation of a pro-atherogenic program[J]. Nucleic Acid Res，2005，33(16)：5308－5319.
[11] Alevy Y G，Slavin R G，Hutcheson P. Immune response in experimentally induced uremia. Ⅰ. Suppression of mitogen responses by adherent cells in chronic uremia [J]. Clin Immnuol Immunopathol，1981，19(1)：8－18.

（编辑 王小寒）

文章编号：1000-5404(2008)15-1433-01

个案与短篇

22 例颈部大血管损伤的救治体会

胡 崇，白祥军 （华中科技大学同济医学院附属同济医院创伤外科，武汉 430030）

颈部大血管损伤的危害性不仅在于短时间内的大出血，而且在于对大脑血供的影响及血肿对气道的压迫[1]，若不及时采取正确的抢救措施，随时会有死亡的危险。现就我院 1996－2006 年急诊收治的 22 例颈部大血管损伤的救治情况报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组 22 例，其中男性 20 例，女性 2 例，年龄 7～54 岁，平均 28.6 岁。致伤原因：车祸伤 3 例，刀伤 12 例，爆炸伤 1 例、摔跌伤 2 例，重物砸伤 3 例，医源性伤害 1 例。

损伤血管 24 支：颈总动脉 5 支、颈内动脉 7 支、颈外动脉 4 支、颈内静脉 4 支、锁骨下动脉 2 支、锁骨下静脉 2 支。损伤类型：断裂 5 例、全层裂伤 10 例、伴血栓形成 9 例。

就诊时间为 20 min 至 49 d。首诊病例 12 例，平均就诊时间为 2.1 h，11 例表现为颈部伤口出血，1 例表现为颈肩部淤血肿胀。转诊病例 10 例，其中 7 例有颈部清创手术史，转诊原因：3 例术后伤口反复出血，1 例颈部肿痛，6 例出现昏迷、偏瘫、失语等神经系统症状。伤后出现神经系统异常症状时间为伤后 2～24 h，平均 13 h。

合并损伤：原发颅脑损伤 6 例，颈椎骨折 2 例，锁骨骨折 1 例，血气胸 2 例，颅神经损伤 3 例，臂丛损伤 3 例，四肢骨折 3 例，腹部闭合性损伤 2 例。休克 10 例。

1.2 治疗方法

10 例颈部伤口大出血休克的伤者，均先暂行局部按压止血，快速建立静脉通道，气管插管，紧急手术探查。发现颈总动脉、颈内动脉、颈内静脉、锁骨下动脉破裂各 1 例，分别予修补；颈总动脉、锁骨下动脉断裂各 1 例，分别予吻合，其中 1 例伴颈外动脉破裂予结扎；1 例颈内动脉缺损较大，予颈内动脉远端和颈外动脉近端端端吻合。另颈外动脉、颈内静脉、锁骨下静脉破裂各 1 例均予结扎。颈Ⅲ区颈内动脉小破裂 1 例予修补＋颞浅动脉-脑膜中动脉吻合；颈外动脉断裂 2 例予结扎；颈总动脉栓塞 1 例行手术取栓；总动脉＋颈内动脉栓塞 2 例行保守治疗；颈内动脉栓塞 2 例，1 例行颞浅动脉-脑膜中动脉吻合，1 例予保守治疗。颈内静脉及锁骨下静脉栓塞者予保守治疗。

2 结果

22 例颈部大血管损伤患者中，10 例行紧急血管探查，7 例经修复重建及 3 例行血管（颈外动脉、颈内静脉及锁骨下静脉）结扎的患者均恢复良好。11 例患者在检查确诊后，1 例颈内动脉小破裂予修补＋颞浅动脉-脑膜中动脉吻合，恢复良好。2 例颈外动脉断裂予结扎恢复良好。5 例颈动脉栓塞病例中，1 例手术取栓后神志恢复、偏瘫情况明显改善；1 例行颞浅动脉-脑膜中动脉吻合者昏迷程度明显改善；3 例栓塞行静脉溶栓等保守治疗者昏迷程度稍改善，病情稳定后出院。2 例颈内静脉及 1 例锁骨下静脉栓塞者予保守治疗恢复良好。另 1 例因车祸致颈部肿痛、吞咽困难 3 d 来院者，CT 示颈前、纵隔及右颈部创口内大量积气，肺部感染、胸腔及心包积液，急诊行清创引流术，术后 12 h 因颈部突发大出血死亡，考虑颈动脉破裂。

（下转 1437 页）

作者简介：胡 崇，女，湖北省武汉市人，硕士，主治医师，主要从事创伤方面的研究。电话：13971099719

收稿日期：2008-01-03；修回日期：2008-04-21