论著

文章编号:1000-5404(2009)14-1358-04

银杏苦内酯B对急性肺损伤小鼠肺组织NF-κB表达的影响

罗真春[1],黄 燕[2],秦开秀[1],凌宗秀[1] (重庆医科大学附属第二医院:[1]急诊科,[2]麻醉科,重庆 400010)

摘 要:目的 研究银杏苦内酯B(BN52021)对脂多糖(LPS)诱发的急性肺损伤小鼠肺组织中核转录因子κB(NF-κB)蛋白质表达的影响。**方法** 健康昆明小鼠50只,随机分为2组:LPS组和BN52021预处理组。每组又根据不同的观察时间点(0、1、3、9 h和12 h)随机分为5个亚组,每组5只小鼠。通过检测肺湿质量/干质量值(W/D)初步判断肺功能,普通光镜观察HE染色肺组织的病理变化,Western blot检测NF-κB p65在蛋白水平上的表达差异,ELISA法测定肺组织匀浆中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)及白细胞介素-10(IL-10)浓度。**结果** LPS注射后,LPS组W/D显著升高,提示存在肺水肿;BN52021预处理组在不同时间点的W/D均低于LPS组($P<0.05$,$P<0.01$)。LPS注射后1 h即有明显炎症反应的病理变化:两组光镜下均显示肺泡出血及中性粒细胞浸润,但BN52021预处理组明显轻于LPS组。LPS组NF-κB p65呈双峰表达,峰值分别为LPS注射后1 h和9 h;BN52021预处理组NF-κB p65呈单峰表达,峰值出现于9 h,除9 h外,各时间点BN52021预处理组NF-κB p65的表达均低于LPS组($P<0.05$)。与LPS组相比,BN52021预处理组可以明显降低TNF-α的表达($P<0.05$),但2组IL-10峰值无统计学意义。**结论** BN52021通过抑制NF-κB的早期活化抑制炎症反应,减轻肺组织损伤。

关键词: 急性肺损伤;银杏苦内酯B;NF-κB

中图法分类号: R392.11;R563.02;R977.6 **文献标识码:** A

Effect of ginkgolide B on NF-κB expression in pulmonary tissue of mice with acute lung injury

LUO Zhen-chun[1], HUANG Yan[2], QIN Kai-xiu[1], LING Zong-xiu[1] ([1]Department of Emergency, [2]Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of ginkgolide B (BN52021) on the NF-κB expression in pulmonary tissue of mice with LPS-induced acute lung injury. **Methods** Fifty Kunming mice were divided into 2 groups at random: LPS group (L group) and BN52021 pretreated group (B group), and then each group was subsequently divided into 5 subgroups according to different time point (0, 1, 3, 9 and 12 h). The mice from corresponding groups received an intraperitoneal injection of normal saline or 20 mg/kg BN52021 followed by an injection of 15 mg/kg LPS 5 min later. The mice were sacrificed in 0, 1, 3, 9 and 12 h after LPS injection. The wet/dry ratio (W/D) was recorded for pulmonary function and the pathological changes of lung tissues stained by HE were examined by light microscopy. The expression of NF-κB p65 was detected by Western blotting, and the levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-10 (IL-10) were determined by ELISA. **Results** The significant increase of W/D was found after LPS injection in L group, which indicated the existence of pulmonary edema; while the W/D in B group was lower ($P<0.05$ or $P<0.01$). The pathological changes of inflammation, such as pulmonary hemorrhage and the inflammatory cells infiltration, were obvious in 2 groups, but that was better in B group. Moreover, the expression of NF-κB p65 displayed double peak at 1 h and 9 h in L group, while there was only one at 9 h in B group. What's more, the value in B group decreased in comparison with L group ($P<0.05$) except for the value at 9 h. At last, the level of TNF-α in B group was lower than in L group, but there was no difference of IL-10 between 2 groups. **Conclusion** BN52021 can induce the inflammation of acute lung injury induced by LPS via inhibiting the early activation of NF-κB.

Key words: acute lung injury; ginkgolide B; NF-κB

作者简介: 罗真春,男,四川省内江市人,硕士,讲师,主要从事急危重症方面的研究,发表论文6篇。E-mail:luozhenchun@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-12-15;**修回日期:** 2009-04-09

急性肺损伤(acute lung injury,ALI)是由多种炎症细胞介导的肺部局部炎症反应和炎症反应失控所致的肺毛细血管膜损伤,为临床最常见的呼吸系统急危重症之一,是目前的研究热点。研究表明,转录因子 NF-κB 在 LPS 诱发的炎症反应中起着重要作用,干预其表达能缓解 ALI[1-4]。银杏苦内酯 B(Ginkgolide B,BN52021)为银杏叶提取物中重要的有效成分之一,具有抗炎、抗休克、抗血栓形成等多种药理作用[5,6]。本研究探讨 NF-κB p65 在 ALI 中的作用及其机制,以及 BN52021 对其的影响,为研究、开发和应用 BN52021 提供理论和实验依据。

1　材料与方法

1.1　动物分组

健康纯种昆明小鼠 50 只 18 ~ 23 g,雌雄兼用,清洁级,由重庆医科大学实验动物中心提供,随机分为 2 组:LPS 组和 BN52021 预处理组,各 25 只。每组又根据不同的观察时间点(0、1、3、9 h 和 12 h)随机分为 5 个亚组,每组 5 只小鼠。

1.2　主要试剂和仪器

脂多糖(LPS, *E coli* $O_{127}:B_8$)购自 Sigma 公司,NF-κB p65 单克隆抗体、TNF-α ELISA 试剂盒、IL-10 ELISA 试剂盒均购自北京晶美工程有限公司,浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。Gel Doc2000 凝胶成像系统(美国 Bio-RAD 公司),ELX800 酶标仪(美国 Bio-TEK 公司)。

1.3　方法

1.3.1　急性肺损伤炎症模型建立　　按照腹腔注射 LPS 15 mg/kg 建立 ALI 模型。动物称质量后计算出所需要的药物体积量。LPS 组在注射 LPS 前 5 min 腹腔内注射等体积的无菌生理盐水(NS),BN52021 预处理组则于注射 LPS 前 5 min 腹腔内注射 BN52021 20 mg/kg。在注射 LPS 后 0、1、3、9、12 h 时间点采样。

1.3.2　标本采集　　采用 3% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉,麻醉后固定于专用手术板上。在预定时间点活杀小鼠取出全肺,用滤纸吸去表面血污。左侧肺叶用于 W/D 值测定;右肺中叶用 10% 甲醛固定,制成石蜡切片;右肺上、下叶称质量后经包装、标记后,置于 -70 ℃冰箱,用于制作肺组织匀浆。

1.3.3　W/D 值测定　　取出左侧肺叶,迅速用滤纸吸取肺表面水分和血液,电子天平称质量。置于 70 ℃烘箱内烘干 72 h 至恒质量,称质量并计算肺组织 W/D 值。

1.3.4　肺组织形态学观察　　右肺中叶制备石蜡切片用于 HE 染色观察肺组织。

1.3.5　Western blot 分析 NF-κB p65 蛋白的表达　　取称质量后的右肺上下叶,按照 100 mg 组织加蛋白裂解液 1 ml 进行冰浴匀浆,充分匀浆后转移到预冷的 4 ℃ EP 管中。以 4 ℃ 10 000 r/min进行低温离心 20 min,取上清液,弃沉渣。将上清液转入新的离心管内,取 10 μl 肺组织匀浆用考马斯亮蓝法进行蛋白定量。取上清液加入等体积的 2 × SDS-PAGE 样品缓冲液,沸水煮 5 min 用带平嘴针头的 25 μl 注射器将已经稀释并煮沸的蛋白质样品(15 μg)加入加样孔中,在一加样孔中加入标准蛋白,连接电源电泳。电泳完毕后。样品转移至 PVDF 膜,用 TBS 洗膜 2 次,每次 5 min,加入 5 ml 含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭液,室温旋转式摇床摇动 1 h。弃去封闭液,PBS 洗涤 10 min × 3 次。加入以封闭液稀释的第一抗体(NF-κB p65 1∶800),37 ℃持续摇动 1 h。取出膜,用 PBS 洗涤 10 min × 3 次,加入以封闭液稀释(浓度为 1∶250)的二抗(辣根过氧化物酶标记),37 ℃孵育 1 h。PBS 洗涤 10 min × 3 次。将 PVDF 膜放入 100 ml 新鲜配置的 DAB 溶液中,37 ℃显色 2 ~ 3 min,待蛋白条带清晰后自来水冲洗,吹干,照相。结果用 Gel Doc2000 凝胶成像系统对目的条带进行密度分析,蛋白含量以成像灰度值表示。

1.3.6　TNF-α 和 IL-10 的测定　　取肺组织匀浆,采用双抗体夹心 ELISA 法测定(具体按试剂盒要求进行),用酶标仪在波长 490 nm 处测定 TNF-α $D(490)$ 值,波长 450 nm 处测定 IL-10 $D(450)$ 值,应用 ELISA 分析软件计算其含量。

1.4　统计学处理

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

2　结果

2.1　W/D 值的变化

LPS 组在注射 LPS 后出现 W/D 值升高,以 1 h 后变化明显,至 9 h 达到高峰,以后基本维持在峰值水平;BN52021 预处理组在注射 LPS 后 W/D 值变化缓慢,3 h 与 1 h 无显著性差异($P > 0.05$),3 h 后明显变化,9 h 达峰值,后 W/D 值有所恢复。2 组在 0 h W/D 值处于同一水平,2 组间无显著性差异($P > 0.05$)。BN52021 预处理组在 1、3 h W/D 值均低于 LPS 组,具显著性差异($P < 0.05$);9 h 和 12 h 具非常显著性差异($P < 0.01$)。见表 1。

表 1　肺组织 W/D 值变化($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	1 h	3 h	9 h	12 h
LPS 组	3.48 ± 0.36	4.02 ± 0.18	4.26 ± 0.15[a]	4.88 ± 0.40[a]	4.83 ± 0.11[a]
BN52021 预处理组	3.46 ± 0.28	3.50 ± 0.24[b]	3.82 ± 0.20[b]	3.88 ± 0.40[c]	3.65 ± 0.30[c]

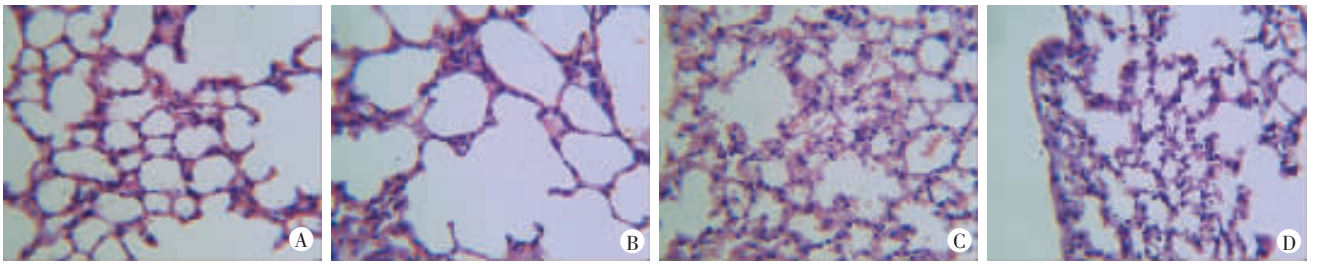
a:$P < 0.05$,与 LPS 组 0 h 比较; b:$P < 0.05$, c:$P < 0.01$, 与 LPS 组比较

2.2　肺组织形态学结果

0 h 小鼠肺组织小叶结构清晰,肺泡腔清净,肺泡间质无炎性浸润,纤维结缔组织无增生,肺泡壁无增厚,支气管黏膜上皮完整,气管壁无炎症细胞渗出;注射 LPS 后 2 组均可见肺泡壁增宽,肺泡间质有炎性浸润,肺泡腔内可见出血和渗出;在各时间点 BN52021 预处理组的病理改变明显好于 LPS 组。见图 1。

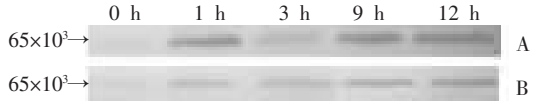
2.3　Western blot 检测结果

LPS 组在注射 LPS 后 1 h NF-κB 明显活化表并迅速达到峰值。3 h 时较 1 h 有所下降,至 9 h 再次出现第 2 峰值;BN52021 预处理组在注射 LPS 后 NF-κB 活性变化缓慢,至 9 h 达峰值,此后迅速下降。见图 2。



A:0 h LPS 组; B:0 h BN52021 预处理组; C:1 h LPS 组; D:1 h BN52021 预处理组

图1 2 组小鼠肺组织形态学改变(HE×400)



A: LPS 组; B: BN52021 预处理组

图2 2 组小鼠肺组织 NF-κB Western blot 检测结果

2 组在 0 h NF-κB 活性处于同一水平,2 组间无显著性差异($P>0.05$);LPS 组在观测时间段内出现 2 个峰值(分别位于 1 h 与 9 h),而 BN52021 预处理组只有 9 h 1 个峰值。在 1、3 h 和 12 h BN52021 预处理组 NF-κB 活性明显低于 LPS 组,2 组间具显著性差异($P<0.05$,$P<0.01$);在 9 h 2 组 NF-κB 活性处于同一水平,2 组间无显著性差异($P>0.05$)。见表 2。

表2 2 组小鼠注射 LPS 后不同时间肺组织 NF-κB 的表达灰度
($n=5$, $\times10^6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	0 h	1 h	3 h	9 h	12 h
LPS 组	43.25±0.82	163.90±4.42[a]	98.30±1.42[a]	108.49±5.84[a]	82.14±2.64[a]
BN52021 预处理组	42.91±0.53	62.47±1.39[c]	81.86±2.19[b]	113.62±3.81	59.49±2.58[b]

a:$P<0.05$,与 LPS 组 0 h 比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$, 与 LPS 组比较

2.4 TNF-α 和 IL-10 的测定结果

LPS 组在注射 LPS 后 TNF-α 迅速升高,至 3 h 达到高峰,以后基本维持在峰值水平;BN52021 预处理组在注射 LPS 后 TNF-α 缓慢升高,至 3 h 达峰后明显下降,至 9 h 基本维持在同一水平,9 h 与 12 h 无显著性差异($P>0.05$)。2 组在 0 h TNF-α 浓度处于同一水平,2 组间无显著性差异($P>0.05$)。各时间点 BN52021 预处理组均明显低于 LPS 组。在 1、3、9 h 和 12 h TNF-α 浓度都具非常显著性差异($P<0.01$)。见表 3。

表3 2 组小鼠注射 LPS 后不同时间 TNF-α 与 IL-10 的变化
($n=5$, pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	0 h	1 h	3 h	9 h	12 h
TNF-α					
LPS 组	52.79±12.45	127.80±14.31[a]	222.18±16.18[a]	192.27±21.49[a]	181.61±20.44[a]
BN52021 预处理组	52.37±12.51	69.64±13.67[c]	96.85±11.90[c]	60.69±2.44[c]	71.44±12.13[c]
IL-10					
LPS 组	65.99±14.48	89.30±12.59[a]	157.25±20.40[a]	132.54±11.37[a]	127.16±8.19[a]
BN52021 预处理组	69.94±9.23	83.62±7.50	89.05±12.43[b]	159.80±14.62	155.19±13.53[b]

a:$P<0.05$,与 LPS 组 0 h 比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$, 与 LPS 组比较

LPS 组在注射 LPS 后 IL-10 开始升高,至 1 h 后变化明显,3 h 达峰,以后缓慢下降,9 h 后基本稳定,9 h 与 12 h 比较无显著性差异($P>0.05$);BN52021 预处理组在注射 LPS 后 IL-10 缓慢升高,至 3 h 后变化加快,至 9 h 达峰,后基本维持在同一水平。9 h 与12 h 无显著性差异($P>0.05$)。2 组在 0 h IL-10 浓度处于同一水平,无显著性差异($P>0.05$);LPS 组与 BN52021 预处理组比较峰值浓度无显著性差异($P>0.05$),但 BN52021 预处理组与 LPS 组相比峰值后移(LPS 组峰值位于 3 h,而 BN52021 预处理组峰值位于 9 h);9 h 后 BN52021 预处理组 IL-10 水平高于 LPS 组,2 组间具显著性差异($P<0.05$)。见表 3。

3 讨论

ALI 主要是以中性粒细胞(PMN)肺浸润为主的一种肺部炎症性损伤,是肺组织失控性炎症反应。目前参与 ALI 发病的细胞因子和释放这些因子的细胞种类基本已确定,但这些细胞因子是如何表达和调控的尚不清楚。近期研究显示,NF-κB 参与了炎症反应的发生,它可以调节多种细胞因子的基因表达[7-10],对炎症的发展有重要的调节作用。

在制作 ALI 的动物模型中,目前认为采用 LPS 注射法建立动物 ALI 模型其病理生理改变与人 ALI 更为接近,是关于 ALI 最常用的动物模型。模型的建立与 LPS 的剂量有关。目前认为 LPS 剂量 <6 mg/kg 为建立全身炎症反应综合征(SIRS)模型,而 >10 mg/kg 为建立 ALI 模型[7]。因此,本实验采用 LPS 15 mg/kg 建立 ALI 模型。通过 W/D 值检测肺功能,HE 染色观察形态学的改变,证实 ALI 动物模型被成功复制。

Western blot 检测结果提示 NF-κB 在 LPS 诱导的 ALI 中明显活化,且呈时间依赖性。随着 LPS 的刺激时间的推移, NF-κB 的表达呈由弱转强,又转弱的趋势, 并于 LPS 致伤后 1 h 达高峰, 3 h 时较 1 h 有所下降,至 9 h 再次出现第 2 峰值,呈动态变化。对于 NF-κB 的双峰表达,本实验结果与 Gukovsky 等[11]的研究结果一致:NF-κB 呈双阶段激活,分别发生在 0.5 ~2 h 及 8 ~12 h。同时,我们发现机体内重要的细胞因子 TNF-α 和 IL-10 的表达呈单峰形式,其峰值多在 3 h。其可能的原因为:在致病因素作用下引起 NF-κB 的早期活化,早期 NF-κB 激活后,产生的 TNF-α、IL-1β 等前炎性因子,可以互相激活各种炎性细胞和细胞因子,启动细胞因子网络系统,形成正反馈,进一步导致

NF-κB 第2阶段的激活。因此,NF-κB 表现为双峰表达。

本实验通过使用 BN52021 预处理动物模型后,无论是从肺功能(W/D 值)检测,还是从病理形态学观察,都表明 BN52021 能够抑制 ALI 的发展,达到治疗效果。在病情缓解的同时,NF-κB 以及 TNF-α、IL-1β 的表达在 BN52021 预处理组比未处理明显降低。因此 BN52021 的治疗效应很可能是通过 NF-κB 途径,通过抑制早期 NF-κB 的活化,从而调节相关致炎细胞因子的表达来达到减轻肺水肿、改善肺的换气功能,减轻 ALI 时的肺损伤程度的目的。BN52021 抗 ALI 机制的初步阐明将为其临床治疗寻找新的可能途径奠定理论基础。

参考文献:

[1] Haddad J J. Science review: Redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for nuclear factor-kappaB[J]. Crit Care, 2002, 6(6): 481-490.
[2] 郭振辉, 洪 新, 毛宝龄,等. 核因子-κB 活化在急性肺损伤发病中的作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2003, 12(9): 597-599.
[3] 邹显巍, 吴 珊. 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[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(19): 1859-1862.
[4] 陈海龙, 李海龙, 李树英, 等. 核因子-κB 在大鼠重症急性胰腺炎肺损伤中的作用及不同药物的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2007, 16(4): 373-377.
[5] 陆国华, 单仁飞, 周建英, 等. 金钠多对脂多糖所致急性肺损伤大鼠的保护作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2006, 15(8): 711-714.
[6] 孙慧萍, 沈 丹, 吕娟丽, 等. 银杏苦内酯 B 的药理学研究概述[J]. 中国药师, 2008, 11(8): 983-985.
[7] Chen Lf, Fischle W, Verdin E, *et al*. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation[J]. Science, 2001, 293(5535): 1653-1657.
[8] Qu J, Zhang J, Pan J, *et al*. Endotoxin tlerance inhibits lipopolysaccharide-initiated acute pulmonary inflammation and lung injury in rats by the mechanism of nuclear factor-kappaB[J]. Scand J Innunol, 2003, 58(6): 613-619.
[9] 王 谦, 宋 勇, 施 毅. 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子对失血性休克诱导急性肺损伤小鼠器官组织核转录因子-κB 活化的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(5): 295-298.
[10] 胡明冬, 徐剑铖, 周长喜, 等. 不同剂量鞭毛蛋白致大鼠急性肺损伤的对比研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(1): 48-51.
[11] Gukovsky I, Gukovskaya A S, Blinman T A, *et al*. Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis[J]. Am J Physiol, 1998, 275(6 Pt 1): G1402-G1414.

(编辑 栾 嘉)

文章编号:1000-5404(2009)14-1361-01

个案与短篇

食管结扎法治疗晚期自发性食管破裂

朱 勇,陈良万,林若柏,周 仑,林培裘 (福建医科大学附属协和医院胸心外科,福州 350001)

自发性食管破裂又称布尔哈夫综合征(Boerhaave's syndrome),是胸外科严重的急症,临床上误诊率及死亡率较高。如果发病超过24 h则病死率明显增高,Kottsis 等[1]将其称为晚期自发性食管破裂。我科于1995年10月至2007年6月收治12例晚期自发性食管破裂患者,治疗均采用可吸收线结扎颈腹段食管的方法,疗效满意,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组12例患者,男性10例,女性2例,年龄33~70岁,主要临床表现分别为剧烈胸痛、胸闷、气促、上腹剧痛、呕吐、发热等。诊断除依据病史及体征外,主要依靠胸部X线片,表现为液气胸、纵隔内气肿或液平,并经食管造影见造影剂外溢至胸腔或纵隔;胸腔穿刺或引流抽及胃液样胸水或食物残渣,口服美蓝胸液蓝染而明确诊断。发病至手术时间最短的1例为25 h,其余11例超过48 h,最长为90 d。

作者简介:朱 勇,男,福建省福州市人,博士研究生,主治医师,主要从事胸腔外科方面的研究,发表论文5篇。E-mail: dr.zhuyong@163.com
通信作者:陈良万,电话:(0591)83301393
收稿日期:2008-09-09;修回日期:2008-11-07

1.2 手术方法

开胸吸除胸腔内脓液及食物残渣,清洗胸腔,寻找食管破裂口,以3-0或4-0可吸收线间断缝合。对于破口大、污染严重的病例不强求一定要缝合。本组10例缝合,2例无法缝合。缝合后的裂口或无法缝合的裂口可用带蒂胸膜、大网膜、肋间肌瓣及止血纱布等覆盖加强。上腹正中切开于贲门上方游离腹段食管,将可吸收线绕过食管,结扎线不宜过细以免割断食管,一般选1-0 Vicryl或Dexon,于结扎线与食管之间垫一直径2~3 mm的硬管,结扎闭合食管腔后抽出该管,这样可避免结扎过紧致食管壁坏死。之后行空肠造瘘置入一导管至空肠注入流质用,胃造瘘置一导管至胃底持续吸引胃液。切开左颈部,游离颈段食管,同上法结扎食管腔,于结扎线上方0.5 cm处切开食管放入T型管以吸引唾液。

2 结果

本组12例患者预后良好,1例术后10 d死于心衰,余11例术后均随访1年以上,生活质量良好,能口进普食,未出现结扎后食管割断及坏死,无术后食管狭窄。结扎后17~21 d可吸收线水解吸收,食管复通。颈部切口唾液逐渐减少,21 d左右愈合。食管破口愈合的时间长短不一,愈合最快的1例于术后

(下转1380页)