基础研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0024-05

NF-κB 和 HMGB1 在大鼠肠缺血再灌注肺损伤中的表达及白藜芦醇苷的保护作用

杨廷芳,王兴勇,胡语航,徐 静,熊 燚,周海银,何 蓉,许 峰
(重庆医科大学附属儿童医院 ICU,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨肠缺血再灌注(Intestinal ischemia-reperfusion,IIR)肺损伤核转录因子-κB(Nuclear factor-kappaB, NF-κB)的活性和高迁移率族蛋白 1(High mobility group box 1,HMGB1)基因表达及白藜芦醇苷(Polydatin,PD)的保护作用。方法:54 只 Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分成对照组、肠缺血 45min 继以再灌注组(再灌注 0.5 h、2 h、6 h)及肠缺血 45 min 继以再灌注同时给予 PD 治疗组(再灌注 0.5 h、2 h、6 h)。采用比色法检测肺组织髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)水平、免疫组化法检测细胞间黏附分子-1(Intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)和 NF-κB 的表达、RT-PCR 检测肺组织高迁移率族蛋白 1(HMGB1)mRNA。结果:IIR 后肺组织明显水肿、出血和炎性细胞侵润。与对照组相比,肺组织 W/D、MPO 水平明显升高,ICAM-1 及 NF-κB 的蛋白表达,HMGB1mRNA(2 h、6 h)的表达增强($P<0.05$);白藜芦醇苷干预后肺损伤程度减轻、各项指标明显改善($P<0.05$)。结论:PD 可以减轻肠缺血再灌注肺损伤,作用机制可能与其抑制 NF-κB 活化,降低肺组织 HMGB1mRNA 的表达上调密切相关。

【关键词】肠缺血再灌注;肺损伤;核转录因子-κB;高迁移率族蛋白 1;白藜芦醇苷
【中国图书分类法分类号】R605.975 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-22

Expressions of HMGB1mRNA and NF-κB in lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats and protective effects of polydatin

YANG Ting-fang, et al
(*Department of ICU, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the activity of nuclear factor kappaB (NF-κB) and the gene expression of high mobility group box 1 (HMGB1) in lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion (IIR), and to investigate the protective effect of polydatin(PD) in this lung injury. *Methods*: Fifty-four male Sprague-Dawley rats weighing 200~250 g were randomly divided into control group, IIR group (45 min intestinal ischemia with 0.5 h or 2 h or 6 h reperfusion) and PD group [IIR with PD (10 mg/kg) treatment].The level of pulmonary myeloperoxidase (MPO) was detected by colorimetric method, the expressions of NF-κB and ICAM-1 by immuneochemistry and that of pulmonary HMGB1mRNA by RT-PCR respectively. Results: Lung injury induced by IIR was characterized by pathological damage of edema, hemorrhage and inflammatory cell infiltration. Compared with control group, pulmonary W/D and MPO increased significantly($P<0.05$).Positive expressions of NF-κB p65 and ICAM-1 protein, and HMGB1mRNA(2 h、6 h) also increased significantly($P<0.05$). After administration of PD, the levels of pulmonary indices were improved significantly($P<0.05$), pulmonary damage alleviated compared with IIR group($P<0.05$), and the expresion of NF-κB became weak. Conclusion: Injection of polydatin before reperfusion could alleviated lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats in vivo, which is possibly through inhibiting pulmonary NF-κB activation and attenuating the expression of HMGB1mRNA during lung injury in rats.

【Key words】Intestinal ischemia-reperfusion(IIR);Lung injury;Nuclear factor-kappaB(NF-κB);High mobility group box1(HMGB1);Polydatin(PD)

核转录因子-κB(Nuclear factor-kappaB,NF-κB)是一组重要的转录因子,活化的 NF-κB 可启动和调节众多与免疫和炎症反应有关的细胞因子及黏附分子等炎性介质的基因表达[1]。高迁移率族蛋白 1(High mobility group box 1,HMGB1)使内皮细胞、肠上皮细胞、中性白细胞上的 1 个或多个信号路径激

作者介绍:杨廷芳(1978-),女,硕士,
研究方向:MODS 基础与临床研究。
通讯作者:王兴勇,男,教授,E-mail:wxy9918@vip.sina.com。
基金项目:重庆市卫生局基金(2-147)。

活,启动细胞外信号调控激酶(Extracellular signal-regulated kinase1/2,ERK1/2)、苏氨酸激酶 Akt 和 NF-κB 等的活化[2]。肠缺血再灌注(Intestinal ischemia-reperfusion,IIR)肺损伤 NF-κB 及 HMGB1 的参与及白藜芦醇苷(Polydatin,PD)的保护作用少见报道。本研究采用大鼠小肠缺血疾病模型,探讨肠缺血再灌注肺损伤的信号转导机制及白藜芦醇苷的保护作用。

1 材料和方法

1.1 动物分组及模型的制备

健康雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 54 只,体重 200 ~ 250 g(重庆医科大学实验动物中心提供)。实验前禁食 12 h,自由饮水,随机分为假手术对照组 C(n=18);除不夹闭 SMA 外,其他手术步骤同手术组;IIR 组(n=18):阻断肠系膜上动脉(Superior mesenteric artery,SMA)45min 后松夹,分别再灌注 0.5 h、2 h、6 h;PD 干预组(n=18):在阻断 SMA45min 后松夹同时给予 PD (10 mg/kg),并分别再灌注 0.5 h、2 h、6 h。腹腔注射 10%水合氯醛(3 ml/kg)麻醉后,仰卧固定于手术板上。腹部常规消毒后无菌条件下取腹正中切口约 3 ~ 4 cm 入腹,将肠管推向左侧,游离肠系膜上动脉 SMA,以无创伤动脉夹夹闭 SMA 起始部,缝合切口[3]。45 min 后经原切口进腹,取出动脉夹,恢复血供。再灌注结束后,动物脱颈处死,打开胸腔从右心室灌洗肺组织后,取下各肺叶分别放于冻存管中于 -70℃冰箱中保存,置于 10%福尔马林中固定。

1.2 主要试剂

RT-PCR 反应试剂盒 (TaKaRa 生物工程有限公司),总 RNA 抽提试剂盒(GENEMEGA 公司),免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),髓过氧化物酶(Myeloperoxidase,MPO)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),ICAM-1 (CD54) 多克隆抗体 (武汉 Boster 生物工程有限公司),NF-κBp65 单克隆抗体(Santa Cruz 公司)。

1.3 检测方法

1.3.1 肺组织病理形态学观察 肺组织用 10%中性福尔马林固定,梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋,切片厚约 6 μm,脱蜡后,用苏木素 - 伊红(HE)染色法染色,中性树脂封片,光镜下观察。

1.3.2 肺组织湿干重比值(W/D)测定 大鼠处死后,立即取部分肺组织称湿重(W)并记录,而后置于 80℃烘箱烘干 48h 至恒重,称干重(D),求得湿干比值(W/D)。

1.3.3 肺组织酶及蛋白检测 肺组织 MPO 酶活力检测采用比色法,具体操作按说明书进行;免疫组织化学染色法检测肺 NF-κBp65 和 ICAM-1(CD54)表达:按 SABC 试剂盒说明书操作,于 400 倍光镜下连续观察 5 个视野对肺组织免疫组织化学图片进行半定量计数分析。

1.3.4 肺组织 HMGB1mRNA 表达检测 取肺组织约 50 mg,依据 EGgenoTM 总 RNA 提取试剂盒提取 RNA,采用半定量 RT-PCR 技术对转录产物进行扩增,以三磷酸甘油醛脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrognase, GAPDH) 作为内参对照。所用引物序列如下:HMGB1(680bp)[4]:上游引物序列:5'-ATGGGCAAAGGAGATCCTA-3',下游引物序列:5'-ATTCATCATCATCATCTTCT-3'; GAPDH(520bp)[5]:上游引物序列 5'-TCGGAGTCAACGGATTTGGTCGTA-3',下游引物序列:5'-ATGGACTGTGGTCATGAGTCCTTC-3'。反应条件:预变性 94℃ 4 min;后续循环:94℃加热变性 50 s;55℃退火 50 s;72℃延伸 50 s,共进行 35 个循环,最后一轮循环 72℃延伸 4 min。所有 PCR 产物标记后于 -20℃保存备用,然后取 PCR 产物 7μl 点样于 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳,溴化乙啶染色鉴定,拍照,用凝胶图像分析系统进行密度扫描分析定量,以目的基因与内参对照积分光密度的比值作为基因表达的相对含量。

1.4 统计学处理

数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS12.0 统计软件进行 2 组均数间比较,t 检验及方差分析,$P<0.05$ 为差异有显著意义,$P<0.01$ 为差异有非常显著意义。

2 结 果

2.1 肺组织病理学改变

对照组肺组织仅有轻微的肺间质增宽改变;而 IIR 组中,0.5 h 组肺间质增宽,有少量中性白细胞侵润;2 h 组肺间质明显增宽,有大量中性白细胞侵润和少量红细胞渗出;6 h 组可见肺泡结构破坏,肺泡隔增宽且肺泡间隔有大量中性白细胞侵润,肺泡腔内有渗出液、红细胞及渗出的中性白细胞;PD 组较 IIR 组有明显的改善(图 1)。

2.2 肺组织 W/D 值的变化

IIR 组再灌注后,随时间的延长,肺组织的 W/D 值逐渐升高,在再灌注 6 h 达到高峰并显著高于对照组($P<0.01$);PD 治疗组肺组织 W/D 较 IIR 组明显下降($P<0.01$),较对照组表达有统计学意义($P<0.05$)(表 1)。

2.3 肺组织 MPO 活性的检测

IIR 组随再灌注时间的延长,MPO 活性逐渐升高,再灌注 0.5 h 组较对照组 MPO 的活性升高有非常显著的统计学意义($P<0.01$);再灌注 2 h 后 MPO 的活性显著升高持续至 6 h 达高峰,较对照组有显著的升高($P<0.01$)。PD 治疗组 MPO 的水平明显下降($P<0.05$)(表 1)。

2.4　肺组织中 NF-κBp65 和 ICAM-1 的表达

肺组织 NF-κBp65 的表达在对照组胞浆中呈浅棕色，为弱阳性表达，胞核中极少或没有阳性表达。而 IIR 组的的表达不仅分布在胞浆中，在细胞核中也呈较强棕色表达，且随着再灌注时间的延长表达增强。ICAM-1 的阳性表达主要在胞核中，随着再灌注时间的延长表达升高。PD 治疗组两者的表达介于对照组与 IIR 组之间。与对照组相比，IIR 组 NF-κBp65 及 ICAM-1 的表达有统计学意义（P<P0.05）。与 IIR 组相比，PD 治疗 2 h 和 6 h 组 NF-κBp65 和 ICAM-1 的表达差异有统计学意义（P<0.05）（表 2、3，图 2、3）。

表 1　各组不同时点肺组织 W/D 和 MPO 活性的变化（$\bar{x}\pm s$，n=6）

组别	W/P			MPO（U/g）		
	0.5	2	6	0.5	2	6
C	4.85 ± 0.22	4.91 ± 0.19	4.93 ± 0.20	1.02 ± 0.12	1.05 ± 0.15	1.11 ± 0.15
IIR	6.03 ± 0.14$^{(1)}$	6.71 ± 0.31$^{(1)}$	7.23 ± 0.15$^{(1)}$	1.61 ± 0.15$^{(1)}$	3.31 ± 0.31$^{(1)}$	3.58 ± 0.28$^{(1)}$
PD	5.24 ± 0.34$^{◆(2)}$	5.60 ± 0.22$^{(1)(2)}$	6.48 ± 0.30$^{(1)(2)}$	1.34 ± 0.151$^{(1)▲}$	2.71 ± 0.16$^{(1)(2)}$	2.95 ± 0.13$^{(1)(2)}$

注：与 C 组比较，$^{(1)}P$<0.01，$^{◆}P$<0.05；与 IIR 比较，$^{(2)}P$<0.01，$^{▲}P$<0.05

表 2　各组不同时点肺组织 ICAM-1（个/HP）的阳性表达情况（$\bar{x}\pm s$，n=6）

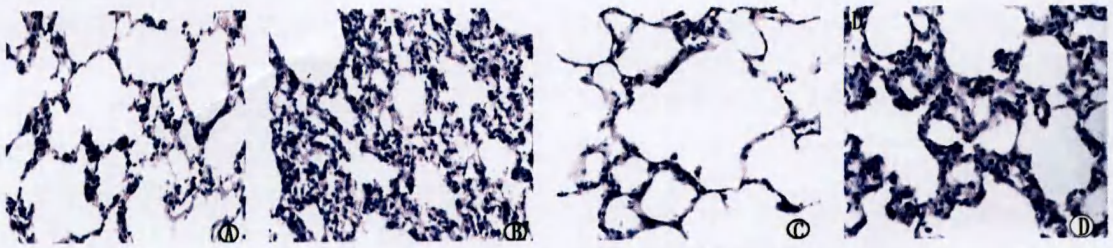
组别	0.5	2	6
C	26.00 ± 13.54	27.50 ± 14.83	32.17 ± 16.55
IIR	83.17 ± 20.66*	141.83 ± 20.27*	160.67 ± 21.62*
PD	55.33 ± 15.69**	105.83 ± 17.57**	130.17 ± 12.12**

注：与 C 组比较，$^{*}P$<0.01；与 IIR 比较，$^{**}P$<0.05

表 3　各组不同时点肺组织 NF-κBp65（个/HP）的阳性表达情况（$\bar{x}\pm s$，n=6）

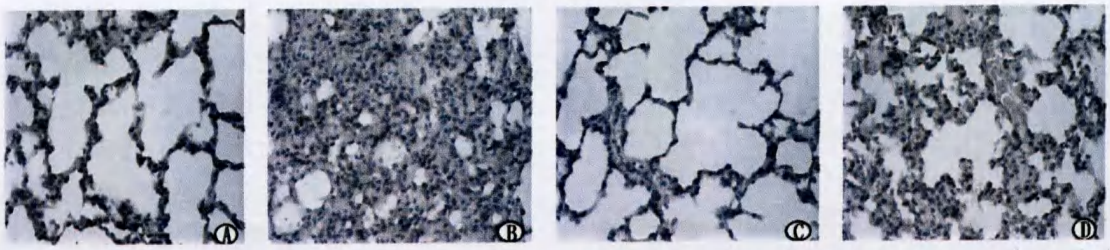
组别	0.5	2	6
C	22.33 ± 10.23	23.17 ± 11.23	26.50 ± 14.21
IIR	39.00 ± 10.64$^{◆}$	97.50 ± 16.86*	120.17 ± 18.68*
PD	29.50 ± 12.41	74.50 ± 17.38$^{*▲}$	87.00 ± 16.59**

注：与 C 组比较，$^{*}P$<0.01，$^{◆}P$<0.05；与 IIR 比较 $^{**}P$<0.01，$^{▲}P$<0.05



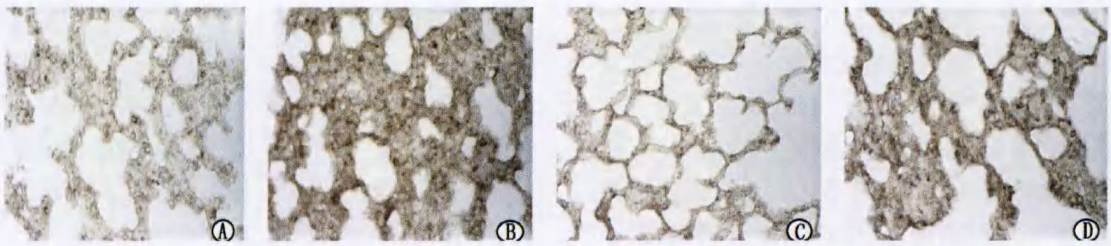
A、B、C、D 分别 IIR0.5 h、IIR6 h、PD0.5 h、PD6 h 组肺组织 HE 染色光镜下图片

图 1　大鼠肺组织 HE 染色（×400）



A、B、C、D 分别 IIR0.5 h、IIR6 h、PD0.5 h、PD6 h 组肺组织 ICAM-1 免疫组化染色光镜下图片

图 2　大鼠肺组织 ICAM-1 免疫组化染色（×400）



A、B、C、D 分别 IIR0.5h、IIR6h、PD0.5h、PD6h 组肺组织 NF-κBp65 免疫组化染色光镜下图片

图 3 大鼠肺组织 NF-κBp65 免疫组化染色（×400）

表 4 各组不同时点肺组织 HMGB1mRNA 的变化情况（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	0.5	2	6
C	0.48 ± 0.12	0.50 ± 0.11	0.52 ± 0.13
IIR	0.64 ± 0.21	0.85 ± 0.24(1)	1.19 ± 0.20(1)
PD	0.54 ± 0.11	0.58 ± 0.16▲	0.81 ± 0.19◆(2)

注：与 C 组比较，(1)$P<0.01$，◆$P<0.05$；与 IIR 比较，(2)$P<0.01$，▲$P<0.05$



A 为内参 GAPDH(520 bp)；B、C 分别为 IIR 组肺组织 HMGB1mRNA(680 bp)分别表达在再灌注 2 h、6 h

图 4 IIR 组肺组织 HMGB1mRNA 表达



A 为内参 GAPDH(520 bp)；B、C、D 为 PD 组肺组织 HMGB1mRNA(680 bp)分别表达在再灌注 0.5 h、2 h、6 h

图 5 PD 组肺组织 HMGB1mRNA 表达

2.5 肺组织 HMGB1mRNA 的表达情况

对照组中 HMGB1mRNA 的电泳条带光密度值较低，IIR 组 2 h 和 6 h 增强（$P<0.01$）。PD 治疗 2 h 和 6h 组电泳条带光密度值较 IIR 下降（$P<0.05$）（表 4，图 4、5）。

3 讨 论

肠是多系统器官功能不全综合征的“启动器官”，肠功能衰竭可以导致全身性炎症反应综合征（Systemic inflammatory response syndrome，SIRS）及多系统器官功能不全综合征（Multiple organ dysfunction syndrome，MODS）。肠缺血的充分耐受损害了肠道系统的屏障功能，激活炎性介质、细胞因子及 PMN，再灌注促进了肠细菌毒素及炎性介质等进入循环系统，触发 SIRS，导致以广泛的微血管渗漏为特点的器官损害，进一步发展出现急性肺损伤（Acute lung injury，ALI）及 MODS[6]。此毒素和炎症因子的作用继续是通过上调 NF-κB 的活化完成的，而 NF-κB 是多种信号传导通路的常见转录因子[1]。活化的 NF-κB 介导诸多炎性介质如 TNF-α、ICAM-1 过度表达，引起多形核白细胞（Polymorphonuclear leukocyte neutrophil，PMN）粘附聚集，导致组织细胞级联放大的炎症损伤反应[7]。小肠缺血再灌注后经过炎症及机体的应激反应产生大量的炎性介质及细胞因子，这些物质在激活 PMN 的同时，也激活了血管内皮细胞；前者在细胞表面表达 CD11/CD18 糖蛋白粘附复合物，后者表达细胞间粘附分子-1（Intercellular adhesion molecule-1，ICAM-1），两者相互结合，引起 PMN 与血管内皮细胞的牢固粘附，从而导致PMN 游走和肺内滞留，导致肺组织损伤[8]。

白藜芦醇苷 PD 即 3’4’5’-三羟基芪-3-β-D-

葡萄糖苷,为二苯乙烯类化合物,对心肌细胞、血管平滑肌细胞、抗血小板聚集、抗氧自由基、抗炎症介质、改善微循环等有显著作用。在对正常大鼠离体工作心脏研究中发现 PD 有明显的正性肌力作用,能减轻休克时的心肌抑制,增强心功能,降低外周阻力,改善休克大鼠血循环,促进微循环的恢复,减轻体外培养心肌缺血缺氧所致损伤。我们前期工作的结果证实 PD 能减轻内毒素休克性肺损伤的病理改变,但机制尚不明确[9]。

本实验结果显示,肠缺血 45 min 再灌注 2 h 和 6 h 均可致明显的肺损伤,表现为缺血再灌注组大鼠肺组织间隔增宽、出血及炎症细胞侵润、肺泡结构破坏,肺组织含水率升高,同时检测到高水平的 MPO 和 ICAM-1 表达,给予 PD 处理后,肺组织的病理改变及含水率明显改善而好于 IIR 组,MPO 及 ICAM-1 蛋白的表达明显下降,MPO 作为 PMN 的特异性酶,其含量的高低可定量反应 PMN 的侵润程度,提示再灌注同时给予 PD 可以减轻缺血再灌注损伤时肺组织中炎症因子 ICAM-1 的表达和 PMN 的聚集侵润。缺血再灌注 IIR 组 NF-κB 的活性与对照组比较有明显的升高,而给予 PD 处理后其活性明显降低,提示 PD 可抑制再灌注损伤早期肺组织 NF-κB 的活化,进而通过抑制诸多炎性介质的过度表达,减轻再灌注损伤肺组织。

HMGB1 与晚期糖基化终末产物受体(Receptor of advanced glycation end products,RAGE)相互作用启动关键细胞信号途径的激活,激活 ERK1/2、P38 和应激活化蛋白激酶/c-Jun 激酶(Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase,SAPK/JUN),且 RAGE 的衔接通过 Ras 还原氧化依赖途径激活 NF-κB。RAGE 作为一种重要的信号转导受体可在多种细胞和不同的炎症性状态时介导维持长效的 NF-κB 激活[10]。研究表明[11]HMGB1 可促进 TNF 从单核细胞中释放,诱导促炎症反应转录因子 NF-κB 的DNA 结合及人类肠上皮细胞样细胞 Caco-2 中氧化氮合酶的表达,并能促进培养人脐静脉内皮细胞中粘附分子的表达。本实验结果显示,HMGB1mRNA 的表达随再灌注时间的延长而升高,与 NF-κB 的激活表达相一致,给予 PD 处理后 HMGB1mRNA 的表达出现显著的降低,因此我们推测,NF-κB 信号转导通路参与了缺血再灌注后肺组织损伤的 HMGB1 基因表达的调控过程,PD 在抑制 NF-κB 激活的同时下调了 HMGB1mRNA 的表达。有研究表明[12]用抗-HMGB1 抗体封闭 HMGB1 的表达可减少出血引起的肺炎症性细胞因子 NF-κB 激活,PMN 积聚和肺间质水肿。但 PD 究竟是通过何种途径或机制影响再灌注损伤肺组织中 NF-κB 的激活和 HMGB1m RNA 的表达上调,尚需进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Zou L, Attuwaybi B, Kone B C, et al. Effects of NF-κB inhibition on mesenteric ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 284(4): G713-G721.

[2] Park J S, Gamboni-Robertson F, He Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290(3): C917-C924.

[3] Berlanga J, Prats P, Remirez D, et al. Prophylactic use of epidermal growth factor reduces ischemia-reperfusion intestinal damage[J]. Am J Patbol, 2001, 161(2): 373-379.

[4] Wen H F, Yong M Y, Zhi G S, et al. The significance of changes in high mobility group ⊨1 protein mRNA expression in rats after thermal injury[J]. Shock, 2002, 17(4): 329-333.

[5] Nagy I, Monge A, Albinger-Hegyi A, et al. NF-κB is Required for survival of immature auditory Hair Cells in vitro[J]. J Assoc Res Otolaryngol, 2005, 6(3): 260-268.

[6] Takayama M, Ishibashi M, Ishii H, et al. Effects of neutrophil elastase inhibitor(ONO-5046) on lung injury after intestinal ischemia-reperfusion [J]. J Appl Physiol, 2001, 91(4): 1800- 1807.

[7] Tian X F, Yao J H, Li Y H, et al. Effect of nuclear factor kappaB on intercellular adhesion molecule 1 expression and neutrophil infiltration in lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats[J]. World Gastroenterol, 2006, 12(3): 388.

[8] Gujral J S, Liu J, Farhood A, et al. Functional importance of ICAM-1 in the mechanism of neutrophil-induced liver injury in bile duct-ligated mice[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 286(3): G499-G507.

[9] Shu S Y, Wang X Y, Ling Z Y, et al. Effect of polydatin on phospholipase A2 in lung tissues in rats with endotoxic shock [J]. Chin J Traumatol, 2004, 7(4): 239-243.

[10] Pullerits R, Brisslert M, Jonsson I M, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products triggers a proinflammatory cytokine cascade via ?2 integrin Mac-1[J]. Arthritis & Rheumatism, 2006, 54(12): 3898-3907.

[11] E.Killeen M, A.Englert J, Stolz DB, et al. The phase 2 enzyme inducers ethacrynic acid dl-sulforaphane and oltipraz inhibit lipopolysaccharide-induced high-mobility group box 1 secretion by RAW 264.7 cells [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316(3): 1070-1079.

[12] Kim J Y, Park J S, Strassheim D, et al. HMGB1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(5): L958-L965.

(责任编辑:冉明会)