维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)02-0141-03

核因子 NF-κB 在急性梗阻性胆管炎所致多器官损害中的作用

冯虎翼,龚建平,涂 兵,石毓君,李旭宏,李生伟,刘长安

(重庆医科大学第二临床学院普通外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:观察核因子 NF-κB 在大鼠急性梗阻性胆管炎(acute obstructive cholangitis,AOC)所致多器官损害中的作用。方法:42 只 Wistar 大鼠随机分为 AOC 组、单纯胆总管结扎组(BDL 组)和假手术组(SO 组),于术后 6h 和 48h 活杀,取肝、心、肺和肾脏组织观察形态学改变,检测上述组织中 NF-κB 活性,作血气分析,测定血清乳酸脱氢酶(LDH)、谷丙转胺酶(ALT)、尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)水平,以及血浆中肿瘤坏死因子(TNF)-α 和白介素(IL)-6 含量。结果:AOC 组动物的肝、心、肺和肾脏组织出现显著病理改变,各组织中 NF-kB 活性较其它组显著增强。AOC 组血气分析结果明显异常,与其它组有显著差异($P<0.05$)。AOC 组的血清 LDH、ALT、BUN 及 Cr 水平以及血浆中 TNF-α、IL-6 含量明显高于其它组($P<0.05$)。结论:在 AOC 期间,肝、心、肺和肾组织中 NF-κB 活性明显增强,同时伴有组织病理改变和器官功能损害,提示 NF-κB 激活在 AOC 所致多器官损害中起重要作用。

【关键词】胆道感染;核因子 NF-κB;多器官损害

【中国图书分类法分类号】R575.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-07-11

The role of NF-κB in multiple organ dysfunction during acute obstructive cholangitis

FENG Huyi, et al

(*Department of General Surgery, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the role of NF-kB activation in the development of multiple organ dysfunction (MOD) during acute obstructive cholangitis (AOC) in rats. *Methods*: 42 Wistar rats were divided into three groups: the AOC group, the group of bile duct ligation (BDL group), and the sham operation group (SO group). All the animals were killed at 6th h or 48th h after operation. Morphological changes in vital organs were observed under light and electron microscope. NF-κB activation was determined with Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). Arterial blood gas analysis was performed. Other parameters included the serum levels of lactate dehydrogenase (LDH), alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr) and the plasma levels of TNF-α and IL-6. *Results*: The significant changes in histology and ultrastructure of vital organs were observed in AOC group. By contrast, in BDL group, all the features of organ damage were greatly reduced. NF-κB activation in various tissues markedly increased in AOC group when compared with other two groups. In addition, the results of blood gas analysis were obviously abnormal in AOC group, and there was a significant difference between AOC and other groups ($P<0.05$). Moreover, in AOC group, the serum levels of LDH, ALT, BUN and Cr and the plasma levels of TNF-α and IL-6 were significantly higher than those of other groups ($P<0.05$). *Conclusion*: The NF-κB activation occurs in many vital organs during AOC, which is associated with histopathological changes and organ dysfunction, so NF-κB activation may play an important role in the development of MOD during AOC.

【Key words】Acute obstructive cholangitis; NF-κB; Multiple organ dysfunction

严重胆道感染是引起多器官功能损害(MOD)和临床患者死亡的重要原因[1]。临床和实验研究表明,单核-巨噬细胞激活并释放多种细胞因子在胆道感染所致的肝、心、肺、肾等多个器官损害中起重要作用[1,3]。核因子 NF-κB 在各种感染性疾病特别是脓毒血症时能被激活,并诱导各种细胞因子转录、合成和释放,最终可能导致多个器官损害[4,5]。我们在以前的研究中发现[1],急性胆道感染患者外周血单核细胞中 NF-κB 活性明显增强。但 NF-κB 激活与 MOD 之间的确切关系仍不十分清楚。本实验通过复制 AOC 动物模型,观察 NF-κB 激活在 MOD 中的作用。

作者介绍:冯虎翼(1966-),男,主治医生,
主要研究方向:肝胆外科的临床与实验。

基金项目:国家自然科学基金资助课题(39970719,30170919)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 动物及实验分组

42 只雄性 Wistar 大鼠体重 250～300g，由重庆医科大学实验动物中心提供。将动物分为 3 组：AOC 组、胆管结扎组(BDL 组)以及假手术组(SO 组)。分别于术后 6h 和 48h 处死动物。每组每时相点 7 只大鼠。

1.2 动物模型制作

所有外科操作在乙醚麻醉下进行。动物模型的制作按 Gong[6] 等介绍的方法进行。AOC 组：在大鼠上腹部作 1.5cm 的正中切口，游离胆总管，双重结扎，向结扎上端的胆总管注射 0.2ml 大肠杆菌 $O_{111}B_4$(5×10^9cfu/ml)悬液。BDL 组：双重结扎胆总管，但不注射大肠杆菌悬液。SO 组：既不注射大肠杆菌悬液也不结扎胆总管，仅进行常规的开腹手术。

1.3 形态病理学观察

所取肝、心、肺和肾脏组织标本用 10%的福尔马林或 2.5%的戊二醛固定。光镜检查的组织块用石蜡包埋，切片用苏木素和伊红(HE)染色。透射电镜检查的组织块用环氧树脂 618 包埋，超薄切片，醋酸双氧铀和枸橼酸铅染色，H－2000 透射电镜下观察。

1.4 凝胶电泳迁移改变分析法(EMSA)

核蛋白的提取　按 Xu 等[7] 介绍的方法进行。主要步骤为：取肝、心、肺和肾脏组织各 0.5g，充分匀浆后，加入核蛋白提取液 A，4℃、1200g 离心，去上清；沉淀加入 NP－40 及核蛋白提取液 B，4℃、1200g 离心，取上清液即为核蛋白。

NF－κB 活性测定　按照 Gong 等[1] 介绍的方法测定 NF－κB 活性。NF－κB 寡核苷酸探针(序列为：5′－GCC TCG AAT GTT CGCGAACTT TCG－3′)购于 Santa Cruz 公司，用 T4 多核甙酸激酶法将 r—[^{32}P]ATP 标记在该探针上，并用无水乙醇将其纯化。所得结果表示转录因子与标记探针结合的相对量。

1.5 动脉血气分析

通过颈动脉插入导管抽取动脉血 1 ml，用血气分析仪测定 pH 值、二氧化碳分压(PCO_2)、和碳酸氢根离子(HCO_3^-)浓度。

1.6 血清参数测定

动物活杀时取静脉血，在全自动生化分析仪上测定乳酸脱氢酶(LDH)、谷丙转氨酶(ALT)、尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)来代表心、肝和肾脏功能损害。

1.7 血浆中细胞因子测定

血浆中 TNF－α 和 IL－6 含量变化用酶联免疫吸附法(ELISA)测定。测定的最低限度 TNF－α 为 50pg/ml、IL－6 为 49pg/ml。所有细胞因子测定为双份，组内和组间差异小于 8%～10%。

1.8 统计学处理

数据用 Excel 5.0 版统计分析程序包对数据进行单因素方差分析，$P<0.05$ 表示有显著差异。

2 结　果

2.1 形态学变化

AOC 组，肝组织中出现局灶性的变性和坏死，肝细胞肿胀，部分发生脂肪变性，胞浆中可见局灶性胞浆变性和多个髓鞘样结构(图 1)，Kupffer 细胞增生，胞浆中有较多溶酶体及髓鞘样结构(图 2)；心肌细胞间水肿、出血，心肌细胞中线粒体肿胀或空化(图 3)；肺泡膈充血、水肿，较多中性粒细胞聚集在肺泡膈毛细血管腔内；肾小管上皮广泛坏死，足细胞肿胀，足突广泛融合。在 BDL 组，各组织中病理改变明显减轻；SO 组无异常形态学改变。

2.2 NF－κB 活性变化

AOC 组，6h 时 NP－κB 活性在肝组织中已显著增强，48h 时，NF－κB 活性在心、肺和肾组织中也明显增强。BDL 组和 S0 组各组织中 NF－κB 活性无显著增强。

2.3 血气分析

AOC 组，动脉血气分析显示，在 6h 时为呼吸性碱中毒，48h 时出现呼吸性酸中毒，与其它两组的相应值比较有显著差($P<0.05$，表 1)。

表 1　3 组动物的动脉血血气分析($\bar{x}\pm s$)

	早期(6h)			晚期(48h)		
	AOC	BDL	SO	AOC	BDL	SO
pH	$7.52\pm0.01^*$	7.46 ± 0.02	7.45 ± 0.02	$7.33\pm0.07^*$	7.67 ± 0.04	7.46 ± 0.03
PCO_2(mmHg)	$33.90\pm0.95^*$	38.10 ± 0.89	38.90 ± 0.94	40.40 ± 4.23	37.80 ± 3.51	37.50 ± 0.72
HCO_3^-(mmol/L)	26.60 ± 0.63	28.30 ± 0.86	27.80 ± 1.04	$20.10\pm1.57^*$	26.70 ± 1.45	27.82 ± 1.25
PO_2(mmHg)	105.10 ± 6.40	108.30 ± 4.20	106.50 ± 5.80	$67.30\pm6.90^*$	104.70 ± 5.30	110.70 ± 4.60

注：与其它组比，$^*P<0.05$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 3 组动物血清参数变化

	早期(6h)			晚期(48h)		
	AOC	BDL	SO	AOC	BDL	SO
LDH(U/L)	817.8±53.5*	246.4±57.1	219.3±34.6	981.4±136.7*	407.5±53.1#	24.3±34.2
ALT(U/L)	132.8±23.5*	20.6±6.2	18.7±5.5	347.7±56.5*	57.3±10.5#	17.3±4.3
BUN(mg/dl)	16.3±13.3	12.9±2.8	11.8±2.2	55.7±15.3*	16.7±4.6	12.5±2.14
Cr(mg/dl)	0.48±0.03	0.42±0.02	0.41±0.03	0.72±0.06*	0.51±0.03	0.47±0.03

注:与其它组比,* $P<0.05$;与 SO 组比,# $P<0.05$。

2.5 细胞因子含量变化

AOC 组,血浆中 TNF-α 和 IL-6 含量在 6h 和 48h 均明显增高,分别较其它两组升高约 4~5 倍($P<0.05$)。BDL 组,TNF-α 和 IL-6 含量在 48h 较 SO 组有明显升高($P<0.05$)。(表 3)

表 3 3 组动物血浆中 TNF-α 和 IL-6 水平($n=7$)

组别	TNF-α(pg/ml)		IL-6(pg/ml)	
	6h	48h	6h	48h
AOC	235±39.23*	429±56.62*	253±23.41*	562±57.58*
BDL	73±11.52	139±16.21#	113±21.39	227±43.02#
SO	72±12.45	74±10.53	109±18.37	113±19.81

注:与其它组比,* $P<0.05$;与 SO 组比,# $P<0.05$。

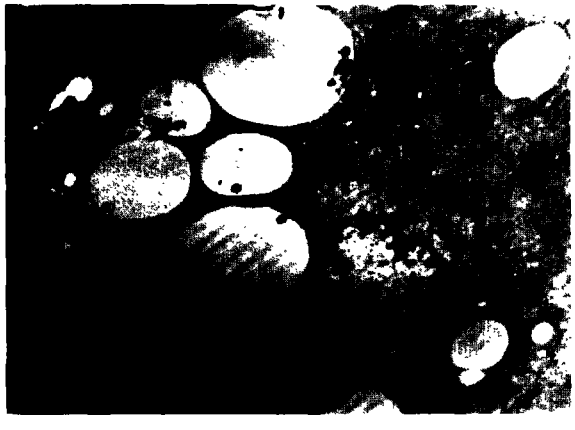


图 1 AOC 组大鼠肝细胞出现脂肪变性、局灶性胞浆变性以及髓鞘样结构(TEM×10000)

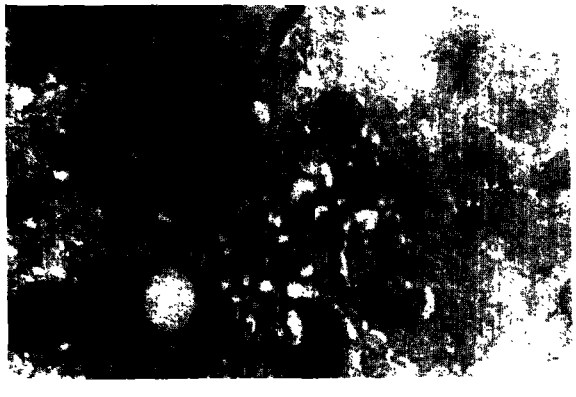


图 2 AOC 组大鼠 Kupffer 细胞的胞浆中可见较多溶酶体及髓鞘样结构(TEM×10000)



图 3 AOC 组大鼠心肌细胞中可见线粒体肿胀及空泡化(TEM×20000)

3 讨 论

AOC 是导致 MOD 和临床患者死亡的重要原因[1~3]。最近的研究显示,感染、创伤等应激情况下能诱导 NF-κB 激活,而激活的 NF-κB 又能介导多种细胞因子和前炎性介质基因的转录、合成和释放[4,5]。这些细胞因子和前炎性介质是脓毒血症和内毒素血症造成 MOD 的重要因子[8]。

关于 NF-κB 激活在各种脓毒血症所致 MOD 中的确切机制尚不完全清楚。Pennington 等报道急性化脓性兰尾炎患者外周血单核细胞中 NF-κB 活性显著升高;Arnalich 等[5]报道 34 例严重脓毒血症患者外周血核单细胞中 NF-κB 活性也明显增强;但 Chen 等通过盲肠结扎加穿孔法将 SD 大鼠造成脓毒血症模型,发现 NF-κB 活性与脓毒血症的严重程度无相关性。我们已前的研究[1]显示重症急性胆管炎患者 NF-κB 活性显著增强,NF-kB 可作为严重应激患者病情严重程度的指标之一。但目前国内外尚无有关 AOC 时 NF-κB 激活与 MOD 的相关性研究报道。

本实验显示,AOC 时 NF-κB 激活同时伴有肝、心、肺和肾等多个脏器形态学改变(下转第 147 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

[2] Zaragoza C, Ocampo CJ, Saura M, et al. Inducible nitric oxide synthase protection against Coxsackievirus Pancreatitis [J]. J Immunol, 1999; 163(10): 5497 - 5504.

[3] Jaworek L, Jachimczak B, Bonior J, et al. Protective role of endogenous nitr - ic oxide in Lipopolysaccharide - induced pancreatic damage[J]. J Physiol pharm - acol, 2000; 51(1)85 - 102.

[4] Andrze Jewska A, Jurkowska G. Nitric oxide protects the ultrastructure of pancreatic acinar cells in the course of caerulein - induced acme pancreatitis[J]. Int J Exp Pathol, 1999; 80(6): 317 - 324.

[5] Nishino T, Watanabe S, Oyama H, et al. An endothelial nitric oxide synthase inhibitor aggravates CDL - induced acute pancreatitis in rats[J]. Pancreas, 1999; 19(4): 396, 400.

[6] Ohta Y, Nishida K. L - arginine protects against stress - induced gastric mucosal lesions by preserving gastric mucus[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2002; 29(1 - 2): 32 - 38.

[7] Brzozowska I, Konturek PC, Brzozowski T, et al. Role of prostaglandins, nitric oxide, sensory nerves and gastrin in acceleration of ulcer healing by melatonin and its precursor, L - tryptophan[J]. J Pineal Res, 2002; 32(3): 149 - 162.

[8] Lomis TL Siffring CW, Chalasanis, et al. Nitric oxide synthase inhibitors N - monomethy larginine and aminoguanidine prevent the progressive and severe hypotension associated with a rat model of pancreatitis[J]. Am surg, 1995; 61: 7.

[9] Szentpali IC Kaszaki J, Eros G, et al. Changes in microcirculation of esophageal mucosa during acute experimental reflux. Pathogenic role of the biliary component[J]. Magy Seb, 2003; 56(2): 61 - 67.

[10] Kaise M, Miwa J, Iihara K, et al. Helicobacter pylori stimulates inducible nitric oxide synthase in diverse topographical patterns in various gastroduodenal disorders[J]. Dig Dis Sci, 2003; 48(4): 636 - 643.

[11] 1, amarque D, Moran AP, Szepes Z, et al. Cytotoxicity associated with induction of nitric oxide synthase in rat duodenal epithelial cells in vivo by lipopolysaccharide of Helicobacter pylori: inhibition by superoxide dismutase[J]. Br J Pharmacol, 2000; 130(7): 1531 - 1538.

[12] Tari A, Kodama K, Kitadai Y, et al. Is apoptosis in antral mucosa correlated with serum nitrite concentration in Japanese Helicobacter pylori - infected patients[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003; 18(5): 498 - 504.

(上接第 143 页)和功能损害，提示 AOC 期间 NF - κB 激活在 MOD 损害中起重要作用。本研究还发现，AOC 期间，各个器官中 NF - κB 的激活时间和程度不尽相同。6h 时，肝组织中 NF - κB 活性已显著增强；48h 时，除肝脏以外的其它器官如心、肺和肾组织才明显表达 NF - κB 活性。提示肝脏是 AOC 时损害最早的器官，同时肝脏中 Kupffer 细胞激活并释放出多种细胞因子在 MOD 中可能起关键作用。

(致谢：本实验在重庆医科大学第二临床学院，重庆市肝胆外科重点实验室完成，特此致谢)

参 考 文 献

[1] Gong JP, Liu CA, Wu CX, et al. Nuclear factor κB activity in patients with acute severe cholangitis[J]. World J Gastroenterol, 2002; 8: 346 - 349.

[2] Zuo GQ, Gong JP, Liu CH, et al. Expression of lipopolysaccharide binding protein and its receptor CD14 in experimental alcoholic liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2001; 7: 836 - 840.

[3] Zhang WZ, Chen YS, Wang JW, et al. Early diagnosis and treatment of severe acute cholangitis[J]. World J Gastroenterol, 2002; 8: 150 - 152.

[4] Paterson RL, Galley HF, Dhillon JK, et al. Increased nuclear factor κB activation in critically ill patients who die[J]. Crit Care Med, 2000; 28: 1047 - 1051.

[5] Arnalich F, Garcia - Palomero E, Lopez J, et al. Predictive value of nuclear factor κB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis[J]. Infect Immun, 2000; 68: 1942 - 1945.

[6] Gong JP, Liu CA, Wu CX, et al. Liver sinusoidal endothelial cell injury by neutrophils in rats with acute obstructive cholangitis[J]. World J Gastroenterol, 2002; 8: 345 - 348.

[7] 徐明清，龚建平，薛 兰，等. Kupffer 细胞 NF - κB 激活对胆道梗阻合并肝部分切除鼠肝细胞再生的影响[J]. 第三军医大学学报，2001; 23: 1143 - 1145.

[8] 龚建平，徐明清，李 昆. 内毒素介导 Kupffer 细胞脂多糖受体 CD14 的表达[J]. 第三军医大学学报，2001; 23: 425 - 428.