维普资讯 http://www.cqvip.com

· 论著 ·

中度低温对急性胰腺炎大鼠核转录因子-κB 表达的影响

王学敏　江伟　周明　赵刚　杭燕南

【摘要】 **目的**　观察急性出血坏死性胰腺炎(AHNP)后不同时间点胰腺和肺组织中核转录因子-κB(NF-κB)的 DNA 结合活性动态变化,以及胰腺炎后应用中度低温对 NF-κB 活性的影响。**方法**　第一部分实验采用牛磺胆酸钠逆行注射造成大鼠 AHNP 模型。大鼠随机分为正常对照组以及 AHNP 常温 2、5 和 12 h 组,用电泳迁移率改变法(EMSA)测定各组大鼠胰腺和肺组织中 NF-κB 的活性。第二部分实验将大鼠随机分为假手术组、AHNP 常温组和低温组,诱导 AHNP 后 2 h 和 5 h 测定各组胰腺和肺组织中 NF-κB 的活性。**结果**　急性胰腺炎后大鼠胰腺和肺组织 NF-κB 活性均持续增强,且各时间点胰腺组织 NF-κB 活性显著强于肺组织(P 均<0.01)。与 AHNP 常温组相比,低温组 AHNP 后 2 h 和 5 h 肺组织 NF-κB 活性均显著降低(P 均<0.01),而胰腺组织 NF-κB 活性与常温组差异不明显。**结论**　急性胰腺炎伴有胰腺和肺组织 NF-κB 活性的显著增强。中度低温对急性胰腺炎后肺组织NF-κB的激活有抑制作用。

【关键词】 胰腺炎,急性;　核转录因子-κB;　低温

Effects of moderate hypothermia on expression of nuclear factor-κB in rats with acute pancreatitis

WANG Xue-min, JIANG Wei, ZHOU Ming, ZHAO Gang, HANG Yan-nan. * Shanghai Sixth People's Hospital, Medical College of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China*
Corresponding author: HANG Yan-nan. Department of Anesthesiology, Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200001, China (Email: prohynnc@online.sh.cn)

【**Abstract**】 **Objective**　To observe the dynamic changes in the DNA binding activity of nuclear factor-κB (NF-κB) in rat pancreatic and lung tissues in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis (AHNP), and investigate the effects of moderate hypothermia on AHNP-induced NF-κB binding activity in a time-dependent fashion. **Methods**　A group of 24 rats was randomly divided into control group, 2, 5 or 12 hours groups after reproduction of AHNP. NF-κB binding activity in pancreas and lung tissues was determined using electrophoretic mobility shift assay (EMSA). In another group of 36 rats were randomized into three groups with equal number: sham-operated rats which were kept under 37-37.5 ℃ after laparotomy; AHNP rats with normothermia (37-37.5 ℃); AHNP rats with moderate hypothermia (32-33 ℃). Activity of NF-κB was assessed at 2 or 5 hours after reproduction of pancreatitis. **Results**　DNA binding activity of NF-κB in pancreas and lung tissue of AHNP rats gradually increased after the development of pancreatitis, and NF-κB binding activity was more prominent in pancreas than that in lung tissue at each time point (all P<0.01). NF-κB binding activity was inhibited at 2 and 5 hours of moderate hypothermia in lung tissue (P<0.01), but there was no difference in pancreatic tissue between normothermic and hypothermic rats at each time point. **Conclusion**　These data suggest that the expression of NF-κB is significantly increased after the development of AHNP. Moderate hypothermia could inhibit the expression of NF-κB in lung tissue in acute pancreatitis.

【**Key words**】 acute pancreatitis;　nuclear factor-κB;　hypothermia

核转录因子-κB(NF-κB)是体内最重要的转录因子之一,在炎症反应调节方面具有重要的作用。急性出血坏死性胰腺炎(AHNP)往往伴剧烈的炎症反应及 NF-κB 活性增加[1],人们在实验中也尝试通过抑制 NF-κB 的激活来减轻急性胰腺炎的病理损害[2,3]。以往的实验显示低温可抑制 NF-κB 激活[4-6],并抑制受 NF-κB 调节的相关炎症因子表达[7]。然而目前关于低温对急性胰腺炎后 NF-κB 活性的影响尚未见报道。本研究拟观察 AHNP 后胰腺和肺组织 NF-κB 表达的变化,以及 AHNP 后应用中度低温对胰腺和肺组织 NF-κB 表达的影响。

1　材料与方法

1.1　主要试剂:牛磺胆酸钠(Sigma),丙烯酰胺、双丙烯酰胺(Amresco),[γ-^{32}P]ATP(北京福瑞生物工程公司),核内容物提取试剂盒(Active Motif),电泳迁移率改变试验(EMSA)试剂盒(Promega)。高速低温离心机(Eppendorf),紫外及可见光分光光度

基金项目:上海市医学领先专业重点学科基金资助项目(993027)

作者单位:200233　上海交通大学附属上海市第六人民医院麻醉科(王学敏,江伟,周明),急诊科(赵刚);上海第二医科大学附属仁济医院麻醉科(杭燕南)

通讯作者:杭燕南,教授,博士研究生导师(Email: prohynnc@online.sh.cn)

作者简介:王学敏(1971-),男(汉族),江西省南昌市人,医学博士,主治医师(Email: wangxm@sjtu.edu.cn)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

计(Spectronic),垂直电泳槽(BIO-RAD),凝胶图像分析系统(SynGene)。

1.2 动物分组:健康雄性 SD 大鼠(复旦大学医学院实验动物中心提供),体重 250~350 g。实验分两部分进行。第一部分:大鼠随机分为正常对照组及 AHNP 后 2、5 和 12 h 组,每组 6 只,大鼠体温控制在 37.0~37.5 ℃。第二部分:大鼠随机分为假手术组(术后体温维持在 37.0~37.5 ℃);AHNP 常温组(术后体温维持在 37.0~37.5 ℃);AHNP 低温组(术后体温维持在 32.0~33.0 ℃),每组 12 只。每组各取半数大鼠分别在术后 2 h 和 5 h 放血处死取标本。

1.3 AHNP 模型制备:大鼠术前 12 h 禁食、不禁水,腹腔注射氯胺酮 100 mg/kg 麻醉,术中和术后躁动时再注射氯胺酮 50 mg/kg 维持麻醉。采用胰胆管内逆行注射质量分数为 5% 的牛磺胆酸钠制成 AHNP模型。假手术组不注入牛磺胆酸钠,钳夹和结扎后松开结扎线和金属夹,其余操作同模型组。

1.4 体温控制:通过在大鼠周围放置冰块和吹风来降低全身温度,通过放置在大鼠上方的灯泡加热来升高体温,在 30 min 内将大鼠体温调节在预定值[8]。温度探头插入直肠约 5 cm,持续监测肛温。每隔 1 h 给各组大鼠腹腔内补充生理盐水 10 ml/kg。

1.5 组织核蛋白提取:AHNP 后 2 h 和 5 h 分别放血处死大鼠后,立即取胰腺、肺组织各 50 mg,组织核蛋白提取参照试剂盒说明书进行。用 Bradford 法测定核蛋白浓度,-70 ℃冻存。

1.6 EMSA:参照试剂盒说明书进行。在 T4 多聚核苷酸激酶催化下,用 γ-^{32}P ATP 标记 NF-κB 探针 5′末端,乙醇沉淀,-20 ℃保存。10 μg 核蛋白与 NF-κB 探针结合,经质量分数为 4% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,-70 ℃放射自显影 12 h。

1.7 统计学分析:实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用方差分析的 Duncan 检验。采用 SAS 统计软件完成。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NF-κB 条带特异性检测(图 1):当未标记的 NF-κB 探针浓度达到标记探针的 100 倍时,竞争结合反应明显,表现为电泳滞后带消失。而加入未标记 SP1 探针时,其对 NF-κB 结合反应无明显影响。

2.2 AHNP 大鼠胰腺和肺组织 NF-κB 活性变化(图 2,表 1):正常对照组大鼠肺组织无明显 NF-κB 激活;AHNP 后 2~12 h NF-κB活性均显著升高(P 均<0.01),胰腺炎后5 h出现峰值,12 h NF-κB 活性无进一步升高。正常对照组大鼠胰腺组织无明显 NF-κB 激活;AHNP 后 2~12 h NF-κB 活性均显著升高(P 均<0.01),其峰值出现于胰腺炎后 12 h,同时在 AHNP 后各时间点胰腺组织 NF-κB 活性均显著强于同时间点肺组织 NF-κB活性(P 均<0.01)。

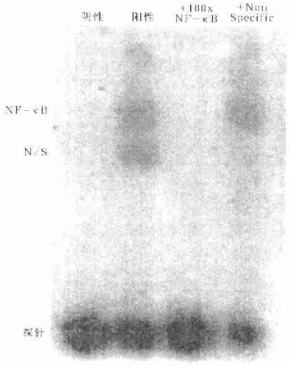
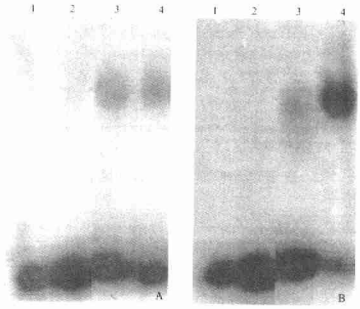


图 1 NF-κB 条带特异性检测

Figure 1 Test for the specificity of the NF-κB band



A 为肺组织;B 为胰腺组织;1 为正常对照组;2、3、4 分别为 AHNP 2、5、12 h 组

图 2 AHNP 大鼠胰腺和肺组织 NF-κB 活性变化

Figure 2 Changes of activity of NF-κB in pancreas and lung tissue in AHNP rats

2.3 低温对 AHNP 大鼠胰腺和肺组织 NF-κB 活性影响(图 3,表 2):低温组 AHNP 后 2 h 胰腺组织 NF-κB活性明显增强($P<0.05$),5 h进一步增强($P<0.01$)。低温组 2 h 和 5 h 胰腺组织 NF-κB 结合活性与常温组比较差异均无显著性。低温组 AHNP后 2 h 肺组织 NF-κB 活性无明显变化,第

维普资讯 http://www.cqvip.com

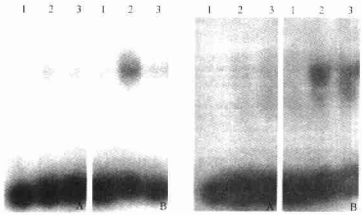
5 h则明显增强($P<0.05$)。低温组AHNP后 2 h和 5 h肺组织 NF－κB 结合活性均明显低于常温组(P 均<0.01)。

表 1　AHNP 大鼠胰腺和肺组织 NF－κB 活性变化($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 1　Changes of pancreatic and lung NF－κB activation in rats after AHNP induction($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别		肺组织(灰度值×10^3)	胰腺组织(灰度值×10^3)
正常对照组		2.96±0.28	2.99± 0.91
AHNP 常温组	2 h	6.52±1.36*△	19.61± 7.85*
	5 h	14.43±2.07*△	33.69±12.10*
	12 h	12.85±4.04*△	110.24±44.68*

注：与正常对照组比较：*$P<0.01$；与本组同时间点胰腺组织比较：△$P<0.01$



A 为 AHNP 后 2 h；B 为 AHNP 后 5 h；1 为假手术组；2 为 AHNP 常温组；3 为 AHNP 低温组

图 3　低温对 AHNP 大鼠胰腺和肺组织 NF－κB 活性影响

Figure 3　Effects of moderate hypothermia on activity of NF－κB in pancreas and lung tissues in AHNP rats

表 2　低温对 AHNP 大鼠胰腺和肺组织 NF－κB 活性影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 2　Effect of moderate hypothermia on pancreatic and lung NF－κB activation in rats with AHNP($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	胰腺组织(灰度值×10^3)		肺组织(灰度值×10^3)	
	2 h	5 h	2 h	5 h
假手术组	3.38±0.68	4.64± 1.49	3.05±0.39	3.20±0.34
AHNP 常温组	19.61±7.85*	35.69±12.10**	6.52±1.36**	14.43±2.07**
AHNP 低温组	17.61±7.51*	30.57± 7.05**	2.93±0.22△	5.87±1.44*△

注：与假手术组比较：*$P<0.05$，**$P<0.01$；与 AHNP 常温组比较：△$P<0.01$

3　讨　论

炎性介质，尤其是细胞因子，在急性胰腺炎的发病过程中起关键作用。近年来研究证实，NF－κB 是调节这些炎性介质表达的重要转录因子，其能与多种炎症因子基因的启动子或增强子 κB 位点特异性结合，并启动基因转录。牛磺胆酸钠胆胰管逆行注射造成的 AHNP 模型中，胰腺部分的病理损害往往特别严重，而其他远端器官如肺脏等的损害则要相对轻得多。因此在实验中我们分别观察胰腺和肺组织 NF－κB 的激活情况，研究在 AHNP 后不同器官之间 NF－κB 表达变化的规律有否不同。

我们在实验中发现，AHNP 后 NF－κB 的 DNA 结合活性明显增加，其在 AHNP 后 2 h 就明显出现，并持续至胰腺炎后 12 h。此外我们还发现，在 AHNP 后不同组织，NF－κB 活性增加的程度和峰值出现的时间都不一致。AHNP 后胰腺组织中 NF－κB活性持续增加，其峰值出现在 12 h，而肺组织 NF－κB 激活的高峰在胰腺炎后 5 h，且胰腺组织 NF－κB 活性显著强于同时间点肺组织 NF－κB 的活性。此种现象出现的原因是由胰腺和肺组织本身特性不同造成，还是与胰腺和肺组织局部炎症反应强弱不同有关，尚不清楚。Vaquero 等[3]的研究发现，注射牛磺胆酸钠的 AHNP 模型中，由于胰腺本身头部和尾部病理损害严重程度不一，即使是胰腺不同部位 NF－κB 活性和炎症因子 mRNA 表达水平也有不同。据此推测，这种差异可能与不同部位炎症反应的强弱不同有关。

多种细菌和病毒产物、细胞因子、理化刺激等可激活 NF－κB。有证据显示各种刺激通过多种信号传导机制，提高细胞内氧代谢反应水平，并可能最终影响到 IκB 激酶(IKK)活性[9,10]。多项研究证实低温可以抑制 NF－κB 的激活[5,6]，其机制可能是抑制 IKK－γ 表达和 IKK 酶活性，从而抑制了 IκB－α 的磷酸化和降解，减少了解离的 NF－κB 进入细胞核的数量[4]。氧自由基可以激活 NF－κB[11]，而低温可以抑制氧自由基的生成[12]，这可能也是低温抑制 NF－κB 活性的机制之一。我们在实验中还发现，低温组肺组织 NF－κB 活性明显低于常温组，但胰腺组织两组间无明显差异；而 Roberts 等[13]的研究却显示，4 ℃低温可以促进血管内皮细胞 NF－κB 的激活。低温对 NF－κB 的影响复杂，在不同条件下其影响也可能不同。体内 NF－κB 活性变化是一个多因素综合作用的结果，除了低温对其具有抑制作用以外，各种细胞因子、内毒素等还对其激活有促进作用。低温对胰腺组织 NF－κB 的活性影响不明显，我们设想这可能是由于胰腺组织局部损伤严重，炎症反应剧烈，使得低温对 NF－κB 有限的抑制作用变得不明显。而肺组织局部病变相对较轻，各种炎性介质对肺组织 NF－κB 激活作用亦较轻，故低温组肺组织 NF－κB 活性表现为降低。

维普资讯 http://www.cqvip.com

虽然大多数实验证实抑制 NF－κB 具有保护作用[1-3]，但仍有部分研究显示在抑制了急性胰腺炎所致的 NF－κB 激活后，胰腺炎的病变反而加重[10]。造成这种差异的原因尚不清楚，可能与炎症类型、所用抑制剂及抑制作用是否彻底有关[9]。NF－κB 的靶基因中某些有益的，某些有害的，这也是造成其作用复杂的原因之一[4]。本实验结果显示，中度低温对 AHNP 后肺组织 NF－κB 活性有一定的抑制作用，提示其对 AHNP 可能具有一定程度的保护作用。

参考文献：

1 Zaninovic V, Gukovskaya A S, Gukovsky I, et al. Cerulein up regulates ICAM－1 in pancreatic acinar cells, which mediates neutrophil adhesion to these cells[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000, 279: G666－676.

2 Dunn J A, Li C, Ha T, et al. Therapeutic modification of nuclear factor kappa B binding activity and tumor necrosis factor－alpha gene expression during acute biliary pancreatitis[J]. Am Surg, 1997, 63: 1036－1044.

3 Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, et al. Localized pancreatic NF－kappaB activation and inflammatory response in taurocholate－induced pancreatitis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 280: G1197－1208.

4 Han H S, Karabiyikoglu M, Kelly S, et al. Mild hypothermia inhibits nuclear factor－kappaB translocation in experimental stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23: 589－598.

5 Hassoun H T, Fischer U M, Attuwaybi B O, et al. Regional hypothermia reduces mucosal NF－kappaB and PMN priming via gut lymph during canine mesenteric ischemia/reperfusion[J]. J Surg Res, 2003, 115: 121－126.

6 Irazuzta J E, Pretzlaff R K, Zingarelli B, et al. Modulation of nuclear factor－kappaB activation and decreased markers of neurological injury associated with hypothermic therapy in experimental bacterial meningitis[J]. Crit Care Med, 2002, 30: 2553－2559.

7 王学敏，徐惠芳. 亚低温在急性呼吸窘迫综合征治疗中的应用前景探讨[J]. 中国危重病急救医学，2002，14：761－763.

8 王学敏，江伟，杭燕南，等. 中度低温对急性出血坏死性胰腺炎大鼠胰腺损伤的保护作用[J]. 中国危重病急救医学，2004，16：719－722.

9 Grisham M B. NF－kappaB activation in acute pancreatitis: protective, detrimental, or inconsequential [J]? Gastroenterology, 1999, 116: 489－492.

10 Steinle A U, Weidenbach H, Wagner M, et al. NF－kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis[J]. Gastroenterology, 1999, 116: 420－430.

11 Algul H, Tando Y, Beil M, et al. Different modes of NF－kappa B/Rel activation in pancreatic lobules[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 283: G270－281.

12 Maier C M, Sun G H, Cheng D, et al. Effects of mild hypothermia on superoxide anion production, superoxide dismutase expression, and activity following transient focal cerebral ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2002, 11: 28－42.

13 Roberts J R, Rowe P A, Demaine A G. Activation of NF－kappaB and MAP kinase cascades by hypothermic stress in endothelial cells[J]. Cryobiology, 2002, 44: 161－169.

（收稿日期：2005－01－05 修回日期：2005－10－29）

（本文编辑：李银平）

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国危重病急救医学》杂志第四届编委会名单

总 编 辑：王今达

副总编辑：黄志强（中国工程院院士） 盛志勇（中国工程院院士） 王士雯（中国工程院院士）
王正国（中国工程院院士） 曹尔澄 陈士奎 王宝恩 沈 洪 付小兵 姚咏明
祝兆林 李宗浩 雪 林 李银平

编辑部主任：李银平

编 委：（按姓氏笔划为序）
Ake Grenvik M（美国） John C. Marshall（加拿大） John R. Hewson（加拿大）
Norma J. Shoemaker（美国） 大卫·彼达（美国）
于汉力 马 遂 方 桢 火树华 王 左 王 辰 王佩显 王佩燕 王其芳 王家良
王鲁宁 朱元珏 任新生 匡调元 吴 仪 吴恩惠 张 宏 张人华 张文智 张淑文
李天德 李忠诚 李春盛 杨国栋 杨涵铭 杨瑞和 邱明才 邱海波 陈文彬 陈树勋
陈德昌 周宝桐 周荣斌 金丽娟 侯 灿 俞森洋 胡 森 郝希山（中国工程院院士）
费 舟 贺石林 钟南山（中国工程院院士） 郭 仓 郭大任 高长青 崔玉芳 黄体钢
黄邦汉 黄敬孚 景炳文 蔡映云 樊寻梅 黎占良

特邀审稿编委：罗 涛 黎宝莲 张宪文 翟德佩 王凤楼 王维力 陈乃生 陈宝元 王学谦
金鸿宾 张久山 杨士琨 任 群 孙根义 钱绍诚 高企贤 张望云 秦英智
王家泰 刘克强 张 赛 黎檀实