

核转录因子- κ B 及其抑制因子 mRNA 表达对多器官功能障碍综合征预后判断的作用

高红梅 常文秀 李娜 李燕 曹书华

【摘要】 目的 观察核转录因子- κ B(NF- κ B)及其抑制因子(I κ B)的 mRNA 表达水平在多器官障碍综合征(MODS)患者预后评估中的作用。方法 将 43 例 MODS 患者按预后分为存活组(28 例)和死亡组(15 例),选择同期 10 例健康体检者作为对照。于入院当日使用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定血中单核/粒细胞 NF- κ B mRNA 及 I κ B- α mRNA 的表达水平,并比较存活组与死亡组各项数值。结果 MODS 患者 NF- κ B mRNA 表达水平明显高于正常对照组(1.35 ± 0.53 比 0.74 ± 0.25 , $P < 0.01$),而 I κ B- α mRNA 表达水平明显低于正常对照组(1.24 ± 0.60 比 1.97 ± 0.71 , $P < 0.01$)。死亡组 NF- κ B mRNA 表达水平与存活组比较差异无统计学意义(1.27 ± 0.37 比 1.39 ± 0.60 , $P > 0.05$),而 I κ B- α mRNA 表达水平则明显低于存活组(0.94 ± 0.46 比 1.40 ± 0.61 , $P < 0.05$)。相关分析显示,I κ B- α mRNA 表达水平与急性生理学与慢性健康状况评分系统 II(APACHE II)评分呈明显负相关($r = -0.340$, $P < 0.05$);且当 I κ B- α mRNA 表达水平截断点为 1.34 时,其约登指数在各截断点中最高,为 0.51,特异度为 90.72%,敏感度为 60.75%。结论 I κ B mRNA 表达水平可用来判断 MODS 患者的预后。

【关键词】 核转录因子- κ B; κ B 抑制因子; 多器官功能障碍综合征; 预后判断

Evaluation of nuclear factor- κ B and I κ B mRNA expression in determining the prognosis of multiple organ dysfunction syndrome GAO Hong-mei, CHANG Wen-xiu, LI Na, LI Yan, CAO Shu-hua. Intensive Care Unit of Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China

【Abstract】 **Objective** To observe the value of nuclear factor- κ B(NF- κ B) and I κ B mRNA expression estimation on determining the prognosis of patients with multiple organ dysfunction syndrome (MODS). **Methods** Forty-three MODS patients were divided into two groups based on their prognosis: the survivor group ($n=28$) and the non-survivor group ($n=15$). Another group of 10 healthy persons served as normal control group. The expression of NF- κ B and I κ B- α mRNA levels in monocytes/neutrophils of patients and controls were detected by reverse transcription-polymerase reaction (RT-PCR), and the results were compared among groups. **Results** The expression of NF- κ B mRNA levels of MODS patients was higher than that of normal control group (1.35 ± 0.53 vs. 0.74 ± 0.25 , $P < 0.01$), and the expression of I κ B- α mRNA levels were lower than those of the control group (1.24 ± 0.60 vs. 1.97 ± 0.71 , $P < 0.01$). There was no significant difference in NF- κ B mRNA levels between the survivor group and the non-survivor group (1.27 ± 0.37 vs. 1.39 ± 0.60 , $P > 0.05$), but the expression of I κ B- α mRNA levels in the non-survivor group was significantly lower than that of survivors (0.94 ± 0.46 vs. 1.40 ± 0.61 , $P < 0.05$). The results suggested that there was a negative correlation between the expression of I κ B- α mRNA level and acute physiology and chronic health evaluation II (APACHE II) ($r = -0.340$, $P < 0.05$). Moreover, when the cutoff value of the expression of I κ B- α mRNA level was 1.34, the Youden index was 0.51, and it was the highest in all the cutoff values, and the specificity was 90.72%, the sensitivity was 60.75%. **Conclusion** The expression of I κ B- α mRNA level can be a useful guide for determining the prognosis of patients with MODS.

【Key words】 nuclear factor- κ B; I κ B; multiple organ dysfunction syndrome; prognosis estimation

核转录因子- κ B(NF- κ B)是调节炎症介质基因表达的关键转录因子之一。有研究发现,术后发生多器官功能障碍综合征(MODS)患者的中性粒细胞中 NF- κ B 活性明显高于未发生 MODS 者,脓毒症患者

单核/粒细胞的 NF- κ B 活性与其病死率有相关性,提示 NF- κ B 有可能作为 MODS 的预警指标^[1-2]。NF- κ B 的活性主要由 NF- κ B mRNA 及其抑制因子(I κ B)mRNA 表达水平决定。本研究中主要观察 MODS 患者外周血单核/粒细胞 NF- κ B 及 I κ B 的 mRNA 表达水平对 MODS 预后评估的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料:选择 2004 年 1 月—2006 年 12 月本院重症加强治疗病房(ICU)收治的 43 例 MODS

基金项目:天津市医药卫生科技基金资助项目(03KY02)

作者单位:300192 天津市第一中心医院急救医学研究所

作者简介:高红梅(1966-),女(汉族),天津市人,硕士生导师,主任医师,现在英国伦敦帝国大学皇家医院做访问学者,Email: gao_hongmei@hotmail.com.

患者(MODS组),其中男33例,女10例;年龄24~80岁,平均(57.55±20.35)岁。MODS的诊断按照1995年Marshall提出的标准^[3];疾病严重程度评价按照患者入ICU 24 h内的急性生理学及慢性健康状况评分系统Ⅱ(APACHEⅡ)评分为标准。器官衰竭情况:2个器官者9例,3个器官者12例,4个器官者10例,5个器官者5例,6个器官者4例,7个器官者3例,平均(3.81±1.50)个;发生衰竭的器官和系统:肺脏28例,代谢系统28例,肾脏26例,脑22例,胃肠17例,心脏14例,肝脏10例,循环系统9例,凝血系统8例。在28 d观察期内共存活28例,死亡15例。同期另选10例健康查体者为正常对照组,其中男7例,女3例;年龄30~59岁,平均(51.23±13.29)岁。各组年龄、性别等一般情况经统计学处理差异无统计学意义($P>0.05$),有可比性(表1,表2)。

表1 正常对照组与MODS组患者一般情况比较

组别	例数	年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	性别(男/女,例)
正常对照组	10	51.23±13.29	7/3
MODS组	43	57.55±20.35	33/10
t/χ^2 值		1.377	0.199
P 值		0.175	0.665

表2 MODS存活组与死亡组患者的一般情况比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	衰竭器官数(个)	APACHEⅡ评分(分)
MODS组	43	57.55±20.35	3.81±1.50	23.81±8.33
存活组	28	58.70±20.91	3.04±0.92	20.00±5.22
死亡组	15	55.15±19.75	5.27±1.28	31.75±8.13
F 值		0.512	6.590	5.328
P 值		0.612	0.000	0.000

1.2 临床处理及指标检测:患者入ICU后均接受抗炎、器官功能支持及营养支持等综合治疗。记录患者入ICU后1、3和5 d各项生理指标的最差值;进行APACHEⅡ评分,评价其病情严重程度。在患者入ICU当日晨8时取肘静脉血8 ml,保存待测。

1.2.1 外周血单核/粒细胞收集:取血后用肝素抗凝,生理盐水1:1稀释;取尖型离心管;按1:1~

1:2的体积比加入淋巴细胞分离液(Ficoll液),2000×g离心20 min,收集白膜层离心10 min,弃上清液,加入生理盐水1 ml,用枪头反复吹打数次以充分混匀,然后转移入小离心管(EP管)中离心10 min,弃上清液,收集细胞沉淀,-70℃冻存。

1.2.2 RNA提取:将冻存的外周血单核/粒细胞取出解冻,加入0.5 ml TRIzol溶液混匀,15~30℃静置匀浆液5 min使其充分裂解,加入氯仿0.1 ml振荡混匀后静置2~3 min。2~8℃下12000×g离心15 min,取出无色水层,加入异丙醇0.25 ml混匀后静置10 min,离心10 min,在离心管底部与侧面形成的白色小团沉淀即为RNA;弃上清液,加入体积分数为75%的乙醇0.5 ml冲洗,7500×g离心5 min,弃上清液;干燥RNA沉淀5~10 min,用焦碳酸二乙酯(DEPC)水10~20 μl溶解。

1.2.3 RNA逆转录(RT)检测:RNA样品置于-80℃下暂时存放,配制RT反应体系,充分混合,65℃加热5 min,冰上孵育3 min,加入200 U/μl的鼠源逆转录酶1 μl混匀,置于37℃水浴中孵育1 h,然后72℃加热10 min,将RNA逆转录成为互补DNA,-20℃冻存。

1.2.4 聚合酶链反应(PCR)检测 mRNA:β-肌动蛋白(β-actin)作为内参照,人类β-actin、NF-κB、IκB-α上下游引物均由上海英俊生物技术有限公司合成,β-actin引物设计参照文献[4]方法,NF-κB引物设计参照文献[5]方法,IκB-α引物设计参照文献[6]方法,引物序列见表3。PCR扩增仪条件设定为:94℃预变性5 min,然后进行32个循环,包括94℃热变性1 min,52℃退火1 min,72℃延伸1 min,最后72℃终延伸5 min。β-actin、NF-κB和IκB-α的cDNA经PCR扩增后的产物长度分别为290、406和95 bp。各取β-actin、NF-κB、IκB-α扩增后的产物10 μl,置于新的PCR管中充分混匀,在质量分数为3%的琼脂糖凝胶上电泳(75 V,30 min),溴化乙锭染色,紫外灯下观察结果并拍照,用凝胶成像分析仪进行半定量分析,用NF-κB/β-actin与IκB-α/β-actin

表3 β-actin、NF-κB、IκB-α引物序列

基因	引物序列	扩增产物长度(bp)
β-actin	上游: 5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGGC-3'	290
	下游: 5'-CAGGTCCAGACGCAGGATGGC-3'	
NF-κB	上游: 5'-CACTTATGGACAACATGAGGTCTCTGG-3'	406
	下游: 5'-CTGTCTTGTGGACAACGCAGTGGAAATTTTAGG-3'	
IκB-α	上游: 5'-GCTGAAGAAGGAGCGGCTACT-3'	95
	下游: 5'-TCGTACTCCTCGTCTTTCATGGA-3'	

亮度比表示 NF-κB mRNA 和 IκB-α mRNA 的相对表达量。

1.3 统计学处理:使用 SPSS 10.0 软件,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行单因素方差分析和 q 检验;计数资料采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Logistic 分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 NF-κB mRNA 和 IκB-α mRNA 表达见图 1~3。

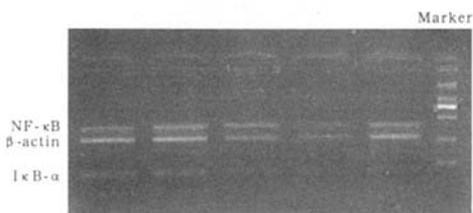


图 1 RT-PCR 检测正常对照组 NF-κB、β-actin 及 IκB-α 的 mRNA 电泳结果

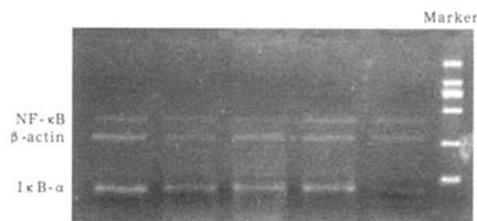


图 2 RT-PCR 检测 MODS 存活组 NF-κB、β-actin 及 IκB-α 的 mRNA 电泳结果

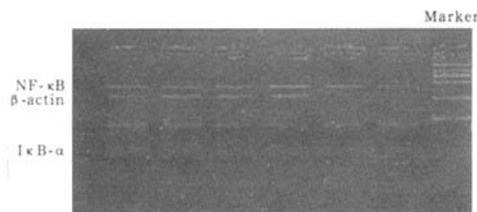


图 3 RT-PCR 检测 MODS 死亡组 NF-κB、β-actin 及 IκB-α 的 mRNA 电泳结果

2.1.1 正常对照组与 MODS 组 NF-κB mRNA 和 IκB-α mRNA 表达水平的比较(表 4):MODS 组 NF-κB mRNA 表达水平明显高于正常对照组,而 IκB-α mRNA 表达水平则明显低于正常对照组,两组比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。

2.1.2 存活组与死亡组 NF-κB mRNA 和 IκB-α mRNA 表达水平的比较(表 4):与正常对照组比较,存活组与死亡组 NF-κB mRNA 表达水平均明显升高(P 均 < 0.01),但两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。存活组 IκB-α mRNA 表达水平略低于

正常对照组,差异无统计学意义($P > 0.05$);而死亡组 IκB-α mRNA 表达水平明显低于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);死亡组 IκB-α mRNA 表达水平亦明显低于存活组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 4 正常对照组与 MODS 组、存活组与死亡组 NF-κB mRNA 和 IκB-α mRNA 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NF-κB mRNA	IκB-α mRNA
正常对照组	10	0.74 ± 0.25	1.97 ± 0.71
MODS 组	43	1.35 ± 0.53 ^a	1.24 ± 0.60 ^a
存活组	28	1.39 ± 0.60 ^a	1.40 ± 0.61 ^b
死亡组	15	1.27 ± 0.37 ^a	0.94 ± 0.46 ^a

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与死亡组比较,^b $P < 0.05$

2.2 MODS 患者 NF-κB mRNA、IκB-α mRNA 表达水平与 APACHE II 评分的相关性分析:IκB-α mRNA 表达水平与 APACHE II 评分呈明显负相关($r = -0.340, P < 0.05$),NF-κB mRNA 表达水平与 APACHE II 评分无相关性($r = 0.181, P > 0.05$)。

2.3 IκB-α mRNA 表达水平和 APACHE II 评分对 MODS 患者死亡预测的受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析(表 5):IκB-α mRNA 表达水平以及 APACHE II 评分对 MODS 的死亡发生均有一定的预测能力($P < 0.05$),曲线下面积(AUC)分别为 0.749 和 0.873。

表 5 IκB-α mRNA 及 APACHE II 评分对 MODS 患者死亡预测的 ROC 曲线分析

预后因素	AUC	标准差 (s)	P 值	95% 可信区间(CI)	
				上限	下限
IκB-α mRNA	0.749	0.075	0.008	0.601	0.897
APACHE II 评分	0.873	0.063	0.000	0.751	0.996

2.4 IκB-α mRNA 表达水平不同截断点对 MODS 死亡预测的评价(表 6):按 ROC 曲线,计算 IκB-α mRNA 表达水平不同截断点对 MODS 死亡预测的敏感度、特异度及约登(Youden)指数。当 IκB-α mRNA 表达水平截断点为 1.34 时,其 Youden 指数在各截断点中最高,为 0.51,且特异度也较高,为 90.72%,敏感度为 60.75%。

3 讨论

MODS 的发病机制非常复杂,炎症介质的大量释放形成逐渐放大的“瀑布样”级联反应是造成器官损伤进而导致 MODS 发生的主要原因^[7]。近期研究发现,参与 MODS 多种炎症介质的基因表达在转录

表 6 IκB-α mRNA 表达水平不同截断点值对 MODS 死亡预测的评价

截断点	敏感度(%)	特异度(%)	Youden 指数
0.49	96.41	26.75	0.23
1.02	75.03	46.72	0.22
1.06	71.41	53.33	0.25
1.15	67.92	60.08	0.28
1.24	60.76	60.07	0.21
1.34	60.75	90.72	0.51
1.40	50.02	90.76	0.41
1.53	42.96	93.33	0.36
1.63	28.62	93.33	0.22

水平受到 NF-κB 调控^[8-9]。NF-κB 是近年来新发现的一种转录因子,哺乳类动物 NF-κB 转录因子家族(又称 Rel 家族)包括 5 个成员:Rel(c-Rel)、RelA(又称为 p65)、RelB、p50(由前体 p105 转变而来,p50 和 p105 均称为 NF-κB1)、p52(由前体 p100 转变而来,p52 和 p100 均称为 NF-κB2)^[10],具有功能活性的 NF-κB 是由上述成员聚合而成的同或异二聚体。大多数 NF-κB 蛋白 N 末端都有一个高度保守、由 300 个氨基酸组成的 Rel 同源性结构域,负责 NF-κB 与 DNA 结合、二聚体化及与 IκB 家族成员相互作用。在体内大多数类型的细胞中,NF-κB 在细胞浆中与 IκB 可逆性结合而处于失活状态^[11]。当肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素、脂多糖(LPS)、病毒感染、炎症细胞因子、氧自由基等刺激后 IKK 激活,使 IκB 分子 N 末端丝氨酸残基区域磷酸化,IκB 被泛素化而从 NF-κB 上脱落,NF-κB 便被活化,活化后的 NF-κB 进入细胞核,与 DNA 上多种基因增强子区域的特异性序列结合,从而调节多种基因的转录。因此,NF-κB 的活化受到 IκB 家族成员的调控。IκB 的主要作用为:①阻止 NF-κB 核移位:IκB 与 NF-κB 形成复合体掩盖核定位位点,使 NF-κB 不能向核内转移。②阻止 NF-κB 与 DNA 结合:IκB 与 NF-κB 作用,影响 NF-κB 与特定基因序列结合。③促进 NF-κB 与 DNA 解离:IκB 使 NF-κB 从 DNA 的 κB 序列解离,并向胞浆转移,抑制相关基因转录。

在临床试验中发现,NF-κB 活化后所致的多种炎症介质释放在 MODS 中起着非常重要的作用,因此有学者提出,NF-κB 活性的高低可以反映 MODS 患者病情的危重程度,对 MODS 的预后具有一定的预警价值^[2]。在本研究中,存活组患者单核/粒细胞 IκB-α mRNA 表达水平略低于正常对照组,死亡组表达水平明显低于正常对照组和存活组,IκB-α mRNA 表达水平与 APACHE II 评分呈负相关。分析

其原因,考虑 IκB-α mRNA 表达升高时,IκB-α 蛋白相应升高,与 p50/p65 结合的 IκB-α 较多,从而抑制 NF-κB 活性,NF-κB 活性下降;IκB-α mRNA 表达较低时,IκB-α 蛋白相应降低,与 p50/p65 结合的 IκB-α 较少,对 NF-κB 的抑制减弱,NF-κB 活性升高。说明 IκB-α mRNA 间接反映 NF-κB 的活性,与 MODS 患者预后呈负相关。

当 IκB-α mRNA 表达水平截断点定为 1.34 时,其敏感度为 60.75%,特异度为 90.72%,Youden 指数为 0.51。由于对死亡预测要求较高的准确程度,当分界值定为 1.34 时,其预测能力分析联合指标即 Youden 指数在各分界值中最高,且其特异度也较高,故可将 1.34 定为判断 MODS 患者预后为死亡的截断点。

参考文献

- [1] Nakamori Y, Koh T, Ogura H, et al. Enhanced expression of intranuclear NF-kappa B in primed polymorphonuclear leukocytes in systemic inflammatory response syndrome patients [J]. J Trauma, 2003, 54(2): 253-260.
- [2] Abraham E. Nuclear factor-kappaB and its role in sepsis-associated organ failure [J]. J Infect Dis, 2003, 187 Suppl 2: S364-369.
- [3] Marshall J C, Cook D J, Christou N V, et al. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome [J]. Crit Care Med, 1995, 23(10): 1638-1652.
- [4] Horwitz B H, Scott M L, Cherry S R, et al. Failure of lymphopoiesis after adoptive transfer of NF-kappaB-deficient fetal liver cells [J]. Immunity, 1997, 6(6): 765-772.
- [5] Caamano J H, Rizzo C A, Durham S K, et al. Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses [J]. J Exp Med, 1998, 187(2): 185-196.
- [6] Franzoso G, Carlson L, Poljak L, et al. Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture [J]. J Exp Med, 1998, 187(2): 147-159.
- [7] 林洪远, 盛志勇. 全身炎症反应和 MODS 认识的变化及现状 [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(11): 643-646.
- [8] Christman J W, Sadikot R T, Blackwell T S. The role of nuclear factor kappa B in pulmonary disease [J]. Chest, 2000(5), 117: 1482-1487.
- [9] 尹文, 虎晓岷, 袁静, 等. 失血合并内毒素诱发多器官功能障碍综合症的分子病理机制研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(3): 143-146.
- [10] Baeuerle P A. The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits [J]. Biochim Biophys Acta, 1991, 1072(1): 63-80.
- [11] Karin M, Yamamoto Y, Wang Q M. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development [J]. Nat Rev Drug Discov, 2004, 3(1): 17-26.

(收稿日期: 2007-08-10 修回日期: 2007-12-06)

(本文编辑: 李银平)