

ω-3 多不饱和脂肪酸对脓毒血症 急性肺损伤大鼠肺组织中核因子 κB 表达的影响

余 刚,何先弟

[摘要]目的:观察 ω-3 多不饱和脂肪酸(ω-3 PUFA)对脓毒血症急性肺损伤(ALI)大鼠肺组织中核因子 κB(NF-κB)表达的影响。方法:将实验动物随机分为对照(A)组、脓毒血症 ALI(B)组、脓毒血症 ALI ω-3PUFA 干预(C)组,每组 10 只,对 B、C 组采用盲肠结扎穿孔(CLP)法建立脓毒血症 ALI 模型,C 组通过颈静脉置管给予含 ω-3 PUFA 的营养支持。分别采用免疫组织化学 ABC 法和 Western blot 法检测 3 组动物肺组织中 NF-κB 的表达情况。结果:A 组大鼠的肺组织中见少量散在的 NF-κB 细胞;在 B 组气道黏膜、肺间质、肺泡腔以及内皮细胞中均可见大量的 NF-κB 细胞;C 组中 NF-κB 阳性细胞的分布情况与 B 组相类似,但较 B 组却有明显减少($P < 0.01$),较对照组明显升高($P < 0.01$)。Western blot 检测显示,3 组大鼠肺组织中 NF-κB 蛋白均表达。结论:ω-3 PUFA 能减少 NF-κB 在脓毒血症所致 ALI 大鼠肺组织中的表达,ω-3 PUFA 通过抑制 NF-κB 途径而减轻脓毒血症所致大鼠 ALI 的炎症程度。

[关键词] 脓毒症;急性肺损伤;核因子 κB;ω-3 多不饱和脂肪酸;大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 631.2;R 563 **[文献标识码]** A

Effect of ω-3 polyunsaturated fatty acids on nuclear factor-κB expression in sepsis induced acute lung injury

YU Gang, HE Xian-di

(Department of Intensive Care Unit, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of ω-3 polyunsaturated fatty acids(ω-3 PUFA) on nuclear factor(NF)-κB expression in the lung tissue of sepsis induced acute lung injury(ALI) rat model. **Methods:** Thirty experimental rats were randomly divided into three groups: healthy controls(A), sepsis group(B) and intervention group(C), ten in each. The sepsis ALI rat model of group B and C was established through cecal ligation perforation, and group C group nutritional support contains ω-3 PUFA through the jugular enous catheter. The expression of NF-κB in the lung tissue of three groups was detected by immunohistochemistry(ABC) and Western blot. **Results:** In group A, only a few scattered NF-κB nuclear positive cells were found; in group B, plenty of NF-κB nuclear positive cells were present in the airway mucous membrane, interstitial lung, alveolar space and endothelial cells($P < 0.01$); in group C, the quantity of NF-κB nuclear positive cells was higher than that in the control group, but decreased significantly than that in ALI group($P < 0.01$). Western blot results indicated that, the expression of NF-κB protein were exist in the three groups. **Conclusions:** ω-3 PUFA can decrease the protein expression of NF-κB in the lung tissue of sepsis induced ALI rat model. ω-3 PUFA could alleviate inflammation by inhibiting activation of NF-κB.

[Key words] sepsis; acute lung injury; nuclear factor-κB; ω-3 PUFA; rats

脓毒血症是继发于严重创伤、感染及大手术后的一种临床综合征,可以导致脓毒症休克以及多器官功能障碍综合征(MODS)。肺脏是脓毒血症过程中最易受损的 7 器官之一。核因子 κB(NF-κB)是细胞内信号转导中的重要信号分子,在正常情况下它是以非活化的形式存在于细胞质中,当受到理化

因素的刺激后,其被激活而转位入胞核,进而诱导细胞因子[白细胞介素-8(IL-8)及肿瘤坏死因子 α(TNF-α)等]和黏附分子[细胞间黏附分子-1(ICAM-1)及血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)等]参与炎症反应。近年来,多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFA)作为一种重要的营养组成成分,成为研究热点^[1-4]。本研究拟通过盲肠结扎穿孔(CLP)复制脓毒血症的急性肺损伤(ALI)动物模型,并检测在 CLP 致伤早期肺组织中 NF-κB 的表达情况,进而探讨 ω-3 PUFA 对早期 ALI 的抑制作用及其作用机制,并为脓毒血症所致早期肺损伤的临床防治提供参考依据。

[收稿日期] 2010-12-11

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2003KJ261)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 重症监护室,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 余 刚(1983-),男,硕士研究生。

[通讯作者] 何先弟,硕士研究生导师,主任医师。E-mail: bbyxyhd@sina.com

1 材料与方 法

1.1 材料 健康清洁级雄性 SD 大鼠 30 只, 体重 200 ~ 250 g, 由蚌埠医学院实验动物中心提供。细胞裂解液 (P0013) 购自碧云天生物技术研究所。鼠单克隆抗体 (SC-8008) 为 Santa 公司产品。辣根酶标记山羊抗大鼠 IgG 购自中杉金桥公司 (ZB-2307, 批号 87054)。 β -Actin (C4): sc-47778 购自 Santa 公司。 ω -3PUFA 购自华瑞公司。化学发光液购自 Millipore 公司。显影液及定影液为 Kodak 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 动物模型的建立及分组 将大鼠随机分为对照 (A) 组、脓毒血症 ALI (B) 组和脓毒血症 ALI ω -3 PUFA 干预 (C) 组, 每组 10 只。实验前, 禁食 16 h, 模型按照 Rittirsch 等^[5]方法制作。将 B、C 组大鼠经 2% 戊巴比妥钠 80 mg/kg 麻醉, 沿腹正中做 5 cm 左右切口, 取出盲肠, 用 3-0 无菌手术丝线中段处结扎, 用 18 号针头穿孔盲肠 2 次, 挤出少量粪便后放入腹腔, 逐层关腹, 术后即刻皮下注射 3 ml/kg 生理盐水复苏, 置笼中每 4 h 观察动物 1 次。C 组大鼠施行左侧颈静脉置管术, 导管经皮下隧道自背部穿出, 由保护装置引出, 单独鼠笼饲养, 术后第 1 天给予肠外营养 (PN) 30 ml/kg, 2 ml/h 维持; 术后第 2 天起给予 PN 60 ml/kg, 2 ml/h 维持, 其他组自由饮食。(C 组 PN 为尤文: 生理盐水 = 1:1)。A 组除不进行 CLP 外, 其余操作同 B 组。72 h 后分别处死大鼠。

1.2.2 肺组织标本的制备 各组大鼠均用 10 g/L 戊巴比妥钠 60 mg/kg 腹腔注射麻醉后开胸, 经右心室肺动脉插管快速灌注生理盐水, 冲洗肺血管内的血液, 剥离左肺, 迅速放入 -80 °C 冰箱中。右肺继续经肺动脉灌注 40 g/L 多聚甲醛固定, 取出肺脏再用 40 g/L 多聚甲醛固定 2 ~ 4 h。标本经 pH 7.4 PBS 充分冲洗后, 放入 200 g/L 蔗糖溶液中过夜。待标本沉入容器后, 将标本切成厚 10 μ m 冷冻切片, 贴于涂有铬钒明胶的载玻片上。

1.2.3 免疫组织化学 ABC 法染色检测 NF- κ B 表达

石蜡切片经二甲苯常规脱蜡, 再经梯度乙醇脱水, 自来水冲洗 3 遍, 蒸馏水冲洗 2 遍。3% H_2O_2 孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶活性, 蒸馏水冲洗 2 次。抗原修复: 将 pH 6.0 的柠檬酸盐修复液加热煮沸, 放入切片, 修复 10 min。取出切片自然冷却, 蒸馏水冲洗 2 遍, PBS 缓冲液冲洗 2 遍。滴加一抗

后将切片放入 37 °C 恒温箱中孵育 30 min, PBS 冲洗 3 遍, 冲洗 3 min。滴加二抗, 37 °C 温箱中孵育 30 min, PBS 冲洗 3 遍, 冲洗 3 min。DAB 显色, 镜下控制显色强度。显色完成以后自来水冲洗, 苏木素复染, 中性树胶封片。镜下观察: 细胞核上存在棕黄色或棕褐色颗粒判为阳性细胞。随机选取背景清晰无细胞坏死、溶解的切片视野做观察和统计, 每例切片随机选择 10 个高倍视野, 每个视野计数 100 个细胞中的阳性细胞数, 取其平均数。

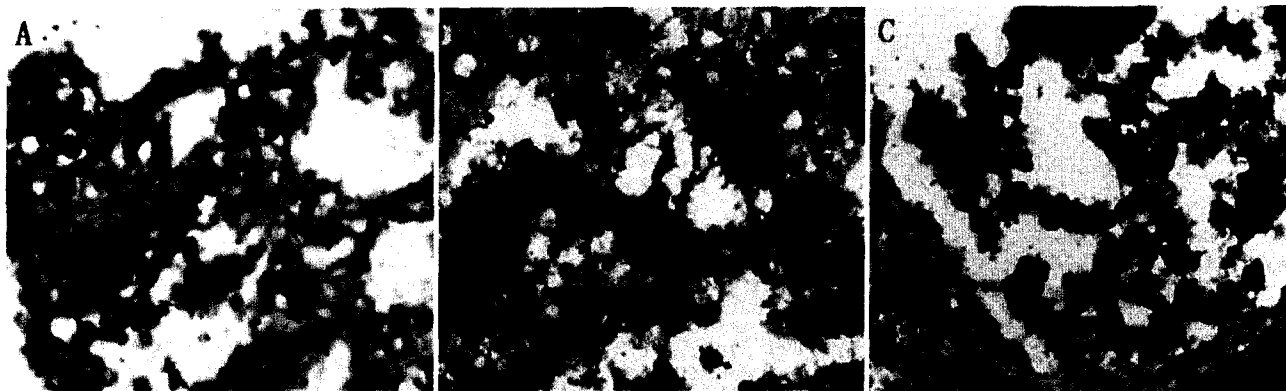
1.2.4 Western blot 检测 NF- κ B 表达 称取肺组织, 并放入置于冰上的匀浆器中, 每 20 mg 肺组织中加入 200 μ l 裂解液 (含 PMSF), 进行匀浆, 裂解 30 min 后, 移入离心管, 4 °C 12 000 r/min 离心 5 min, 取其上清并 -20 °C 保存。配制 SDS-PAGE 凝胶。样品处理: 于沸水中煮 5 ~ 10 min 使其蛋白变性, 后上样。电泳转膜。封闭: 将膜用 TBS 从下向上浸湿后, 移至含有封闭液的平皿中, 室温下脱色摇床上摇动封闭 1 h。一抗孵育: 将一抗用 TBST 稀释至适当浓度, 将抗体溶液加到保鲜膜上; 从封闭液中取出膜, 用滤纸吸去残留液后, 将膜蛋白面朝下放于抗体液面上, 掀动膜四角以赶出残留气泡, 室温下孵育 1 ~ 2 h 后, 置于摇床上用 TBST 再洗 2 次, 每次 10 min, 再用 TBS 洗 1 次。二抗孵育: 室温下孵育 1 ~ 2 h 后, 置于摇床上用 TBST 洗 2 次, 每次 10 min, 再用 TBS 洗 1 次。Western blot 试剂盒显影定影, 曝光并拍照, 记录实验结果。

1.3 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结 果

2.1 3 组中 NF- κ B 表达比较 A 组表现为气道黏膜及肺组织中可查见少量散在的 NF- κ B 细胞, 主要是气道黏膜上皮细胞及血管内皮细胞, 而肺间质细胞中则少见 NF- κ B 的表达 (见图 1A)。B 组大鼠的气道黏膜及肺组织中, 可见大量 NF- κ B 细胞, 于高倍镜下观察发现, NF- κ B 细胞主要为气道黏膜上皮细胞和浸润的炎性细胞、肺上皮细胞及血管内皮细胞 (见图 1B)。C 组大鼠的气道黏膜和肺组织中, 虽然 NF- κ B 细胞的分布情况与 B 组相类似, 但数量却较 B 组明显减少 (见图 1C)。3 组中肺组织 NF- κ B 表达的差异均有统计学意义 ($P < 0.01$) (见表 1)。

2.2 NF- κ B 表达的 Western blot 分析 Western blot 检测显示, 在 3 组大鼠肺组织中 NF- κ B 均有表达, 但蛋白的电泳条带面积不等、颜色深浅不一 (见图 2)。



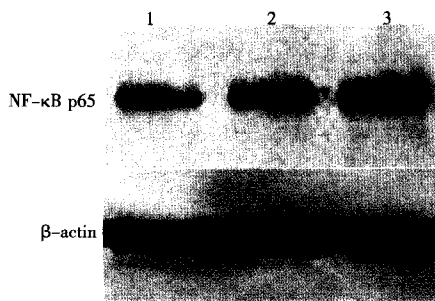
A、B、C 分别示 A、B、C 组

图 1 免疫组织化学染色检测 NF-κB 表达(ABC 法)

表 1 3 组大鼠肺组织中 NF-κB 表达的比较 (n_i = 6; $\bar{x} \pm s$)

分组	NF-κB 细胞(个)	F	P	MS _{组内}
A	4.02 ± 1.31			
B	32.48 ± 5.49 **	74.04	<0.01	17.014
C	22.98 ± 4.38 **#			

q 检验:与 A 组比较 ** P < 0.01; 与 B 组比较 ## P < 0.01



1、2、3 分别示 A、C、B 组

图 2 Western blot 检测肺组织中的 NF-κB 表达

3 讨论

脓毒血症发生的根本原因是由于机体过度释放细胞因子和炎性介质,导致炎症反应的失控以及机体免疫功能的紊乱,从而引起全身多个器官发生功能障碍,严重者可导致多器官功能不全。而肺组织就是最常被累及的器官之一,表现为单核巨噬细胞等炎性细胞的浸润和多种细胞因子及黏附分子的过表达。

ω-3 鱼油脂肪乳剂已应用于临床,在脓毒血症、全身炎症反应综合征(SIRS)、肿瘤、高血脂、严重创伤、外科手术术后等重症疾病的治疗中疗效确切^[4,6-7]。与传统的脂肪乳剂相比,在重症患者营养治疗的领域表现出显著的优越性。Tsou 等^[8]发现,鱼油组大鼠脾细胞中 TNF-α 和 IL-2 mRNA 的表达显著低于大豆油组,虽然各组间炎症因子表达差异无统计学意义,但发现鱼油的介入可以调节 Th1 和

Th2 型细胞因子的表达。Xiong 等^[9]通过肠外途径给予重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)患者含鱼油的脂肪乳剂(鱼油含量为 0.2 g · kg⁻¹ · d⁻¹),结果发现,鱼油组患者的血清 TNF-α 以及 IL-10 水平均低于对照组,并且缩短了 SAP 初期的 SIRS 持续时间,降低了严重性,显示出了鱼油在调节促炎症/抗炎平衡中的作用。Wang 等^[10]通过肠外营养分别给予 SAP 患者含大豆油脂乳剂和含鱼油的脂肪乳剂后发现,补充 PUFA 后的患者促炎症因子生成减少,降低了 SAP 的炎症反应;同时还发现,虽然鱼油组患者急性肾损伤的发生率与对照组差异并无统计学意义,但鱼油组患者使用持续性肾替代治疗的时间显著缩短。Oz 等^[11]的实验结果证实,含鱼油的饮食甚至可以防御内毒素所致的 SIRS,使血清中的促炎因子水平下降,器官功能受损程度也明显降低。NF-κB 广泛存在于多种类型细胞中,作为一种 NF,它可以调节大量细胞的应激反应,如免疫应答和炎症反应等,并参与细胞抗凋亡作用相关基因的转录。ω-3 鱼油脂肪乳剂对这些炎症因子的抑制与 NF-κB 激活与调节体系的相互关系,已经成为细胞生物学及免疫学领域研究的热点。

本研究显示,在 CLP 所致的肺组织损伤中,在浸润的炎性细胞、肺泡上皮细胞、血管内皮细胞以及气道黏膜上皮细胞中均可见 NF-κB 的广泛表达。应用 ω-3 PUFA 进行干预处理后,上述细胞中 NF-κB 的表达明显减少。由此我们可以证实,ω-3 PUFA 对脓毒血症的治疗作用是通过抑制 NF-κB 的活化,使其不能进一步与基因中特定的 κB 序列结合,从而降低了多种炎症介质(如 TNF-α、IL-1 及 IL-6 等)的释放,减轻炎症反应。因此,应用 ω-3 PUFA 进行脓毒血症的治疗值得推荐。至于早期应用 ω-3 PUFA 是否可以防御脓毒血症引起的(下转第 334 页)

制细胞增殖,诱导细胞凋亡;(3)减少 HOP、I 型胶原等细胞外基质成分的沉积;(4)通过抑制基质金属蛋白酶抑制剂表达,提高基质金属蛋白酶活性来降解细胞外基质成分;(5)抑制 TGF β 1 表达,阻断 Smads 信号转导途径,从而减少细胞外基质成分分泌。

HOP 是机体的一种非必需氨基酸,为胶原组织的主要成分,约占胶原氨基酸总量的 13.4%。而瘢痕组织是由胶原的异常积聚形成的。胶原以外的蛋白质,除弹性硬蛋白含有 1%~2% HOP 外,均不含 HOP。因此,组织中的 HOP 含量成为衡量机体胶原组织代谢的重要指标。本次实验结果表明,术后 4 周时,C 组硬膜外粘连较 A、B 组轻;硬膜外瘢痕组织中 HOP 含量显著少于 A、B 组,表明姜黄素明显抑制椎板切除术后硬膜外胶原组织增生及代谢,从而减少瘢痕组织的形成,达到减轻粘连的作用。

综上所述,局部应用姜黄素可以预防硬膜外早期纤维化的作用,能够减少细胞外基质成分,减缓纤维化病变的进展、形成和发展;又由于姜黄素价格低廉、资源丰富、无明显毒副作用。因此,姜黄素具有良好的临床应用潜力,但其具体的作用机制仍有待于进一步深入研究。

[参 考 文 献]

[1] Gasifski P, Radek M, Józwiak J, *et al.* Peridural fibrosis in lumbar

disc surgery-pathogenesis, clinical problems and prophylactic attempts[J]. *Neurol Neurochir Pol*, 2000, 34(5): 983-993.

- [2] 李斌,杨丽霞,李亚东,等.姜黄素抗纤维化作用研究进展[J]. *北京中医药大学学报*, 2008, 31(6): 408-411.
- [3] Gambardella G, Gervasio O, Zaccone C, *et al.* Prevention of recurrent radicular pain after lumbar disc surgery: a prospective study[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2005, 92: 151-154.
- [4] 刘双利,侯春林,魏长征,等.新型亮聚糖衍生物预防椎板切除术后硬膜外粘连的实验研究[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2009, 19(10): 769-773.
- [5] Dandekar P, Dhupal R, Jain R, *et al.* Toxicological evaluation of pH-sensitive nanoparticles of curcumin: acute, sub-acute and genotoxicity studies [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(8/9): 2073-2089.
- [6] Pari L, Murugan P. Influence of tetrahydrocurcumin on tail tendon collagen contents and its properties in rats with streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetes[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2007, 21(6): 665-671.
- [7] Jiang Y, Li ZS, Jiang FS, *et al.* Effects of different ingredients of zedoary on gene expression of HSC-T6 cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(43): 6780-6786.
- [8] 周刚,牛建昭,王继峰,等.姜黄素抗肺纤维化大鼠自由基损伤作用的实验研究[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(8): 669-672.
- [9] 胡晓龙,胡大海,韩勇彬,等.姜黄素对瘢痕疙瘩成纤维细胞胶原合成的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(46): 9024-9027.

(本文编辑 刘璐)

(上接第 331 页)全身炎症反应,则有待进一步的临床研究和观察。

[参 考 文 献]

- [1] Arita M, Ohira T, Sun YP, *et al.* Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation[J]. *J Immunol*, 2007, 178(6): 3912-3917.
- [2] Hasturk H, Kantarci A, Goguet-Surmenian E, *et al.* Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis *in vivo* [J]. *J Immunol*, 2007, 179(10): 7021-7029.
- [3] Ariel A, Fredman G, Sun YP, *et al.* Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression[J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(11): 1209-1216.
- [4] Li WD, Dong YJ, Tu YY, *et al.* Dihydroarteannuin ameliorates lupus symptom of BXSB mice by inhibiting production of TNF- α and blocking the signaling pathway NF- κ B translocation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(8): 1243-1250.
- [5] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, *et al.* Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 31-36.
- [6] Moon DO, Kim KC, Jin CY, *et al.* Inhibitory effects of eicosapentaenoic acid on lipopolysaccharide-induced activation in BV2 microglia [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(2): 222-

229.

- [7] Weldon SM, Mullen AC, Loscher CE, *et al.* Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid[J]. *J Nutr Biochem*, 2007, 18(4): 250-258.
- [8] Tsou SS, Chiu WC, Yeh CL, *et al.* Effects of omega-3 fatty acids on inflammatory mediators and splenocyte cytokine mRNA expressions in rats with polymicrobial sepsis[J]. *Nutrition*, 2008, 24(5): 484-491.
- [9] Xiong J, Zhu S, Zhou Y, *et al.* Regulation of omega-3 fish oil emulsion on the SIRS during the initial stage of severe acute pancreatitis[J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2009, 29(1): 35-38.
- [10] Wang X, Li W, Li N, *et al.* Omega-3 fatty acids-supplemented parenteral nutrition decreases hyperinflammatory response and attenuates systemic disease sequelae in severe acute pancreatitis: a randomized and controlled study[J]. *J Parenter Enteral Nutr*, 2008, 32(3): 236-241.
- [11] Oz HS, Chen TS, Neuman M. Nutrition intervention: a strategy against systemic inflammatory syndrome [J]. *J Parenter Enteral Nutr*, 2009, 33(4): 380-389.

(本文编辑 章新生)