

# 核因子- $\kappa$ B 在腹部火器伤肠管穿透后肺组织细胞凋亡中的作用\*

吕辉琴<sup>1</sup> 刘江伟<sup>2△</sup> 高伟<sup>2</sup> 张东<sup>2</sup>

(1 新疆军区联勤部机关门诊部 新疆 乌鲁木齐 830000;

2 兰州军区乌鲁木齐总医院肝胆外科 新疆 乌鲁木齐 830000)

**摘要** 目的:探讨腹部火器伤肠管穿透后核因子- $\kappa$  B 在肺组织细胞凋亡中的作用,了解腹部火器伤肠管穿透后继发性肺损伤机制。方法:健康长白仔猪 42 头随机等分为对照组和伤后 1h、2h、4h、8h、12h 和 24h 组,实验组建立腹部火器伤肠管穿透模型后,用免疫组化图像分析法测定各组肺组织内 NF- $\kappa$  B 活性,同时用 TUNEL 测定肺组织细胞凋亡变化情况。结果:伤后各组肺组织内 NF- $\kappa$  B 活性明显高于对照组,并于伤后 8h 出现高峰。肺组织细胞凋亡指数伤后显著增高( $P<0.05$ ),并与 NF- $\kappa$  B 活性变化基本一致。结论:腹部火器伤肠管穿透后肺组织内 NF- $\kappa$  B 活性增强,肺细胞凋亡增多,从而继发导致肺损伤。

**关键词** 核因子- $\kappa$  B 腹部损伤 火器伤 凋亡 肺损伤

中图分类号:Q95-3 R644 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)04-642-03

## The Role of Nuclear Factor Kappa B in Pneumocyte Apoptosis Induced by Intestinal Perforations Due to Abdominal Firearm Wound\*

LV Hui-qini<sup>1</sup>, LIU Jiang-we<sup>2△</sup>, GAO We<sup>2</sup>, ZHANG Dong<sup>2</sup>

(1. The out-patient Department of the Headquarters of the Xinjiang Military Region, the No55 of Qingnian Road, Urumuqi, Xinjiang, China 830000; 2 Department of Hepatobiliary Surgery, Urumuqi General Hospital of Lanzhou Military region,

Urumuqi, Xinjiang, China, 830000)

**ABSTRACT** Objective: To investigate the effect of NF- $\kappa$  B in signal transduction of pneumocyte apoptosis in order to investigate the mechanism of lung injury. Methods: 42 Chang-Bai piglets were randomized into 7 groups: control group wounded 1hour group, 2hour group, 4hour group, 8hour group, 12hour group and 24hour group. The model of intestinal perforations due to abdominal firearm wound was established in wounded groups. Pulmonary NF- $\kappa$  B activity was detected by immunohistochemical staining and image analysis in all groups. Hepatocyte apoptosis indexes were detected. Results: Levels of pulmonary NF- $\kappa$  B activity in wounded groups were significantly elevated compared with that in control group, and it appeared one peaks in 8h group. Meanwhile, pneumocyte apoptosis indexes increased markedly compared with that in control group ( $P<0.05$ ). All these changes were positive correlation with the changes of pulmonary NF- $\kappa$  B activity. Conclusion: After intestinal perforations duing to abdominal firearm wound, pulmonary NF- $\kappa$  B activity increases and it can induce pneumocyte apoptosis and lung injury.

**Key words:** NF- $\kappa$  B; Abdominal firearm wound; Pneumocyte apoptosis; Lung injury

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R644 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)04-642-03

### 前言

NF- $\kappa$  B 作为一种普遍存在的转录因子,是多种信号传导途径的汇聚点,在调节炎症反应的基因中起关键作用<sup>[1]</sup>。研究表明 NF- $\kappa$  B 活化和内毒素肺损伤中具有重要的作用<sup>[2,3]</sup>,NF- $\kappa$  B 介导的细胞凋亡在肺损伤中可能起重要作用<sup>[4]</sup>。本实验在我们先前建立的腹部火器伤肠管穿透模型基础上<sup>[5,6]</sup>,探讨伤后 NF- $\kappa$  B 在肺组织细胞凋亡中的作用,了解腹部枪弹伤所致肠穿孔后继发性肺损伤的机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物及分组

选用解放军 63650 部队提供的健康长白仔猪 42 头,2-3 月龄,体重  $31.2 \pm 1.4(27-33)$ kg,雌雄不限。实验动物被随机分为 7 组:对照组和伤后 1h、2h、4h、8h、12h 和 24h 组各 6 头。

#### 1.2 枪械参数

军用 54 式手枪,7.62mm 手枪弹,经专业机构校准:子弹出膛初速度 430-435m/s,弹丸重量 5.5g,撞击能量 508.48-520.37J。

#### 1.3 环境

在常温环境下致伤,伤后 15min 内运回动物实验室,常温及动物实验室环境:温度 22℃-24℃,相对湿度 50%-60%。

\* 基金项目:兰州军区医药卫生科研基金资助项目(LXH-2005019)

作者简介:吕辉琴(1956-),男,主任医师,机关门诊部主任,主要从事普通外科基础与临床研究。

Tel: 0991-4980663, E-mail: lhy980663@163.com

△通讯作者:刘江伟,博士后,主任医师,硕士生导师。Tel:13999891506, E-mail: ljw273@sohu.com

(收稿日期:2011-06-25 接受日期:2011-07-21)

#### 1.4 腹部火器伤模型

枪伤前动物常规禁食 12h,自由饮水。5%盐酸氯胺酮注射液 20mg/kg+0.05%硫酸阿托品注射液 0.04mg/kg 对猪耳后肌肉注射麻醉后,将猪行走位悬吊于军用靶场门廊上,四肢自然下垂,完全暴露腹部,于脐水平后方 2cm 处右侧腹壁皱襞下缘无毛区标记射击点,专业射手用手枪距猪侧腹壁 30cm 处瞄准射击点,从右侧腹壁垂直射入,左侧对应位置射出弹头。实验组于伤后相应时间点麻醉开胸,每组动物均取右肺下叶肺组织,10%中性福尔马林固定,常规石蜡切片。对照组除不致伤外,其余步骤与致伤组相同。

#### 1.5 观察指标

1.5.1 免疫组化图像分析法检测 NF- $\kappa$ B 的活性 按 NF- $\kappa$ B/P65 免疫组化试剂盒(购自迈新公司)说明操作。用 Image-pro Plus5.0 医学图像分析软件检测每组细胞阳性染色的累积光密度值,用来表示 NF- $\kappa$ B 的活性。每张切片随机选取 5 个不重叠的高倍镜视野分析,分析过程中所有切片的放大倍数(400 $\times$ )光源强度均相同。

1.5.2 细胞凋亡的原位检测 按 TUNEL 试剂盒(福建迈新公

司)提供的方法进行检测,计算 5 个高倍视野(400 $\times$ )下的凋亡细胞数,凋亡指数以凋亡细胞数/100 个细胞表示。

1.5.3 血浆内毒素测定 显色基质鲎试剂试管法测定内毒素含量,操作按说明书进行。所用试剂为厦门鲎试剂厂产品。

#### 1.6 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,以 SPSS13.0 软件进行数据处理,采用方差分析(ANOVA)及 LSD 检验,以  $P < 0.05$  有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 肺组织 NF- $\kappa$ B 活性变化

NF- $\kappa$ B p65 在正常肺组织内可见阳性细胞表达多分布于肺泡巨噬细胞、中性粒细胞和血管内皮细胞,胞浆阳性。腹部肠管火器伤肠管穿透伤后可见阳性细胞主要以细胞核为主,染色重,胞浆也有少量染色,但染色程度较正常组织浅。用医学图像分析系统检测各组 NF- $\kappa$ B 活性,经统计学处理,伤后各组 NF- $\kappa$ B 活性均明显高于对照组,于伤后 8h 出现高峰( $P < 0.05$ ),并与伤后肺组织细胞凋亡变化基本趋于一致(见表 1)。

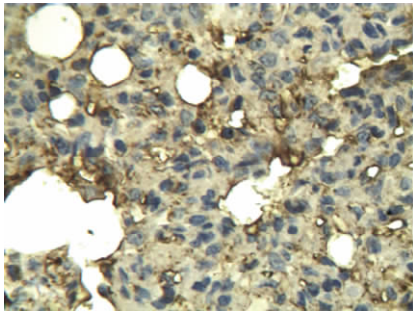


图 1 肺组织细胞 NF- $\kappa$ B 8 小时组(400 $\times$ )

Fig. 1 NF- $\kappa$ B expression in lung 8h group (400 $\times$ )

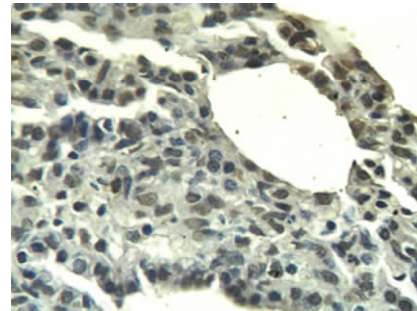


图 2 肺组织细胞凋亡 4 小时组(400 $\times$ )

Fig. 2 Pneumocyte apoptosis 4h group (400 $\times$ )

表 1. 肺脏 NF- $\kappa$ B 活性、肺组织细胞凋亡及内毒素水平变化( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 NF- $\kappa$ B activity, Pneumocyte apoptosis and endotoxin level changes ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	NF- $\kappa$ B activity(IOD)	Pneumocyte apoptosis(%)	Endotoxin level
Control group	6	750.05 $\pm$ 95.57	4.52 $\pm$ 1.51	0.135 $\pm$ 0.029
After wound 1h	6	5191.94 $\pm$ 440.27a	14.88 $\pm$ 2.18b	0.274 $\pm$ 0.034
After wound 2h	6	7925.96 $\pm$ 647.00a	25.3 $\pm$ 5.11b	0.352 $\pm$ 0.063c
After wound 4h	6	10144.91 $\pm$ 745.26a	30.22 $\pm$ 3.62	0.474 $\pm$ 0.070c
After wound 8h	5	13366.43 $\pm$ 1724.69	34.83 $\pm$ 4.2	0.627 $\pm$ 0.083c
After wound 12h	6	13424.92 $\pm$ 1368.85	45.3 $\pm$ 5.89b	0.612 $\pm$ 0.067
After wound 24h	5	12666.52 $\pm$ 1316.06	58.7 $\pm$ 5.51b	0.537 $\pm$ 0.046c

Note: All group compare to control group  $P < 0.05$ , a, b, c all group compare to forward group  $P < 0.05$ .

#### 2.2 肺组织细胞凋亡变化

肺组织内阳性细胞表达主要分布在肺泡隔内、肺泡上皮及血管内皮细胞。伤后各组肺细胞凋亡指数较对照组有明显增加,伤后各时间点间均有显著差异( $P < 0.05$ )。

#### 2.3 内毒素水平变化

实验组各组的血浆内毒素水平均高于对照组( $P < 0.05$ ),并于伤后 8h 达到高峰,伤后 12h 仍维持在高峰值水平( $P < 0.05$ ),伤后 24h 血浆内毒素水平虽然有所下降但仍明显高于对照组

( $P < 0.05$ ),(见表 1)。

### 3 讨论

内毒素在革兰氏阴性菌感染导致的急性肺损伤中发挥重要作用,肠道菌群代谢产物过多或经肠道屏障进入人体循环,形成内源性内毒素血症<sup>[7]</sup>,近年来有研究称肠道不仅是消化吸收的重要场所,同时也是"应激反应的"中心器官"、多脏器功能衰竭(MODS)始动器官<sup>[8]</sup>。

本实验首次通过腹部肠管火器伤动物模型观察了肠穿孔后肺脏 NF- $\kappa$  B 活性和肺组织细胞凋亡的变化,探讨伤后 NF- $\kappa$  B 在肺组织细胞凋亡中的作用,了解腹部火器伤肠管穿透后继发性肺损伤机制。为腹部肠管火器伤后继发性肺损伤和 MODS 的防治提供实验依据。

在火器伤远达效应发生中,生物释放作用使神经体液因子于伤后 10min、2h 和 6h-12h 分别存在一个高峰值,对伤情变化有重要影响<sup>[9]</sup>,腹部火器伤,由于创伤打击,创伤后机体自身应激、肠穿孔后肠内容物所致化学性腹膜炎、穿孔周围肠壁挫裂震荡和烧灼坏死,以及肠屏障受损可能易造成内毒素(LPS)血症、细菌移位和大量炎症因子入血,在原来急性创伤的基础上由于肠穿孔所致腹腔感染会导致脓毒症的发生。近年来研究提示 NF- $\kappa$  B 的激活 ALI/ARDS 中起着关键性的作用,LPS 可诱发肺组织 NF- $\kappa$  B 过度活化,进而启动 sICAM-1、IL-6、TNF- $\alpha$  等细胞因子、黏附因子的转录,其中被活化的 TNF- $\alpha$  可促进肺损伤早期肺泡巨噬细胞<sup>[10]</sup>、上皮细胞<sup>[11]</sup>和内皮细胞<sup>[12]</sup>等多种细胞凋亡,细胞凋亡反过来又促进急性肺损伤时的炎症反应<sup>[13]</sup>。而抑制 NF- $\kappa$  B 可部分抑制炎症反应<sup>[14,15]</sup>。

本研究发现腹部火器伤肠管穿透后肺组织 NF- $\kappa$  B 活性明显增加,可能由于致伤因素的复杂性和多样性使 NF- $\kappa$  B 活性于伤后 8h 出现高峰,12h-24h 逐渐下降,其总的趋势与肺组织细胞凋亡的变化趋势基本一致,相关性分析表明,NF- $\kappa$  B 与内毒素、凋亡的相关系数分别为 0.918、0.871,均呈高度相关性,提示 NF- $\kappa$  B 在腹部火器伤肠管穿透伤后致肺组织细胞凋亡的过程中扮演着重要角色。

综上所述,腹部火器伤肠管穿透后早期肺组织细胞内 NF- $\kappa$  B 即被激活,肺组织细胞凋亡增多,并随着伤后时间的延长而加重。表明伤后启动了以 NF- $\kappa$  B 为中心的级联炎症反应导致肺损伤。基于 NF- $\kappa$  B 在肺组织细胞凋亡中的关键和核心作用,NF- $\kappa$  B 可能是一个极具潜力的新型治疗靶点。

#### 参考文献(References)

- [1] Chen F, Castranofa AS, Tranofa V, et al. New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$  B in cell growth regulation[J]. Am J Pathol, 2001, 159(2):387-397
- [2] Chen ZT, Li SL, Cai EQ, et al. LPS induces pulmonary intravascular macrophages producing inflammatory mediators via activating NF-kappaB[J]. J Cell Biochem, 2003, 89(6): 1206-1214
- [3] Galani V, Tatsaki E, Bai M, et al. The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review [J]. Pathol Res Pract, 2010, 206(3): 145-150
- [4] Liu G, Park YJ, Tsuruta Y, et al. p53 Attenuates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and acute lung injury[J]. J Immunol, 2009, 182(8):5063-5071
- [5] 李泽信, 冯德元, 张永久, 等. 猪腹部火器伤肠管穿透后肝脏功能和形态的变化 [J]. 中国现代普通外科进展, 2007, 10(1): 45-47
- [6] 刘江伟, 张永久, 李泽信, 等. 常温和干热环境下腹部肠管火器伤动物模型的建立[J]. 创伤外科杂志, 2007, 9(5): 408-410
- [7] 刘江伟, 魏巍. 内毒素血症的中西医研究进展[J]. 泸州医学院学报, 2004, 26(4):351
- [8] 黎介寿. 肠衰竭概念、营养支持与肠黏膜屏障维护[J]. 肠外与肠内营养, 2004, 11(2):652-671
- [9] 邓旦, 李树森, 廖明松. 火器伤远达效应研究进展[J]. 西南国防医药, 2003, 13(3): 337-339
- [10] Ortiz LA, Moroz K, Liu Jingyao, et al. Alveolar macrophage apoptosis and TNF alpha, but not p53, expression correlate with murine response to bleomycin[J]. Am J Pathol, 1998, 275(6):1208-1218
- [11] Bermudez L E, Parker A, Petrofsky M. Apoptosis of mycobacterium avium infected macrophage is mediated by both tumor necrosis factor (TNF) and Fas, and involves the activation of caspases [J]. Clin Exp Immunol, 1999, 116(1):94-99
- [12] Hagimoto N, Kuwano K, Kawasaki M, et al. Induction of interleukin 8 secretion and apoptosis in bronchiolar epithelial cells by fas ligation. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999, 21(3):436-445
- [13] Bernard R, Roger M, Walter F, et al. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro[J]. Am J Pathol, 1991, 138(2):447-453
- [14] 柴文成, 范锦秀, 齐志敏, 等. 二硫代氨基甲酸吡咯烷在铜绿假单胞菌肺炎中的抗炎作用[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(2): 206-210
- [15] CHAI Wen-shu, FAN Jin-xiu, QI Zi-min, et al. Anti-inflammation effect of pyrrolidine dithiocarbamate on Pseudomonas aeruginosa induced pneumonia in rats [J]. China Pharmacol Bull, 2008, 24(2): 206-210
- [15] Alvira CM, Abate A, Yang G, et al. Nuclear Factor-B activation in neonatal mouse lung protects against Lipopolysaccharide-induced Inflammation[J]. Am J Respir and Crit Care Med, 2007, 175: 805-815