

· 论 著 ·

# SN50 对缺血再灌注损伤中 TNF- $\alpha$ 影响的实验研究

吴 勇<sup>1</sup>, 叶 芬<sup>1</sup>, 葛轶睿<sup>1</sup>, 陆 燕<sup>1</sup>, 魏锐利<sup>2</sup>

**[摘要]** **目的** 研究核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor-kappaB, NF- $\kappa$ B)抑制剂 SN50 对氧糖剥夺条件下培养的 SD 大鼠巨噬细胞炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )表达的影响。**方法** 用 MTT 法检测 SN50 对细胞增殖活性的影响,以 ELISA 法检测氧糖剥夺条件下 SN50 对 TNF- $\alpha$  表达影响。**结果** 经 SN50 处理的氧糖剥夺条件下的巨噬细胞成活率较未经处理的明显上升( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), TNF- $\alpha$  表达的上调幅度亦明显变小( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论** SN50 主要是通过抑制 NF- $\kappa$ B 核的移位干扰了 TNF- $\alpha$  的基因转录而导致其合成的蛋白量降低。

**[关键词]** SN50;巨噬细胞;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;核转录因子- $\kappa$ B;缺血再灌注

**[中图分类号]** R363 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2014.05.002

## Experimental study of SN50 on TNF- $\alpha$ effects in ischemia-reperfusion injury

WU Yong<sup>1</sup>, YE Fen<sup>1</sup>, GE Yi-rui<sup>1</sup>, LU Yan<sup>1</sup>, WEI Rui-li<sup>2</sup>. 1. Department of Ophthalmology, Nanjing School of Clinical Medicine, Second Military Medical University/Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China; 2. Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of SN50, the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) inhibitor on the expression of macrophage inflammatory factor TNF- $\alpha$  in the oxygen and glucose deprivation in SD rats. **Methods** The effect of SN50 on cell proliferation activity was observed by MTT method. The expression of TNF- $\alpha$  in macrophages after treated with SN50 was observed by ELISA. **Results** The macrophage survival rate was significantly increased after treated with SN50 ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The increase of TNF- $\alpha$  was significantly smaller after treated with SN50 in oxygen glucose deprivation conditions ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** SN50 reduces the expression of TNF- $\alpha$  in macrophages, mainly through inhibiting the translocation of NF- $\kappa$ B nuclear, which provides a theoretical basis for the clinical treatment of ischemic reperfusion injury.

**[Key words]** SN50; macrophages; TNF- $\alpha$ ; NF- $\kappa$ B; ischemia-reperfusion

缺血再灌注损伤的概念是指机体组织缺血一段时间,当血流再次恢复流通后,细胞的结构发生破坏,代谢功能发生障碍,甚至比刚缺血时更加严重,进而导致器官功能进一步损害的综合征<sup>[1]</sup>。眼部很多疾病都存在这种病理生理现象,如急性闭角型青光眼、视网膜中央动脉阻塞、糖尿病性视网膜病等血管的阻塞都可以引起缺血再灌注损伤性眼病<sup>[2]</sup>。肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )主要是由活化的单核-巨噬细胞所产生的具有多种生物学效应的细胞因子,并且在组织和细胞炎症损伤中起着相当重要的作用,常常被作为组织和细胞炎症损伤及其严重程度的重要观察指标<sup>[3]</sup>。研究表明核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor-kappaB, NF- $\kappa$ B)是一种具有多种功能的核转录因子,被激活后可促进

许多种炎症细胞因子及免疫基因的转录;而 SN50 则是一种 NF- $\kappa$ B 的活性抑制肽,具有很强的细胞膜穿透能力<sup>[4]</sup>,可以高效地、特异性地抑制 NF- $\kappa$ B 所诱导的下游基因表达。本研究建立缺血再灌注损伤的细胞模型,再将细胞模型在氧糖剥夺条件下进行培养,通过体外实验来观察和了解 SN50 对缺血再灌注损伤中 TNF- $\alpha$  表达的影响,为眼部缺血性疾病的临床治疗提供理论探索。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂与仪器** SN50(Biomy 公司 美国), TNF- $\alpha$  ELISA Kit(美国 Invitrogen 公司), RPMI 1640 培养液(美国 Gibco 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司), MTT(美国 Invitrogen 公司),细胞培养瓶与细胞培养皿(美国 Corning 公司), RORMA 3131 三气培养箱(美国 Thermo Scientific 公司), HERAEUS PICO 17 离心机(美国 Thermo Scientific 公司), FORMA 700 超低温冰箱(美国 Thermo Scientific 公司), ECLIPSE Ti 倒置显微镜(日本 Nikon 公司), MULTISKAN

**基金项目:** 国家自然科学基金(81200719)

**作者单位:** 1. 210002 江苏南京,第二军医大学南京临床医学院(南京军区南京总医院)眼科; 2. 200003 上海,第二军医大学附属长征医院眼科

**通讯作者:** 魏锐利, E-mail: ruiwei@126.com

MK3 酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司)。

**1.2 动物的分组** 取健康的成年 SD 大鼠 30 只,7~8 周鼠龄,体重 180~200g,由南京军区南京总医院比较医学科提供,实验动物使用许可证号:SYXK(军)2007-029。随机分为氧糖剥夺组、正常对照组及氧糖剥夺+SN50 处理组,每组 10 只。

**1.3 巨噬细胞的分组造模** 各组大鼠先予巨噬细胞行原代培养,即以 20 mg/mL 戊巴比妥钠注射液按 35 mg/kg 剂量鼠腹腔注射麻醉。经腹主动脉放血,以大鼠眼球苍白为放血充分后,游离大鼠气管,固定 PE 软管,注射器抽吸后灌洗生理盐水,每次灌注生理盐水 10 mL,充分灌洗大鼠的肺泡巨噬细胞。离心收获的生理盐水,800 r/min(离心半径 8 cm)离心 5 min,去除上清液,以细胞培养液重悬,并予肺泡巨噬细胞计数备用。用上述方法获取 SD 大鼠的肺泡巨噬细胞,将含有巨噬细胞的细胞培养液以 800 r/min(离心半径 8 cm)离心 5 min,去除上清液,生理盐水洗涤 2 次。生理盐水重悬巨噬细胞,将巨噬细胞放入培养皿内。

氧糖剥夺组:把含有巨噬细胞的培养皿放在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>+3% O<sub>2</sub>+92% N<sub>2</sub> 的三气培养箱内。

正常对照组:把含有巨噬细胞的培养皿放入 5% CO<sub>2</sub>,37 ℃,饱和湿度环境下进行培养。

氧糖剥夺+SN50 处理组:将巨噬细胞放入培养皿后,加入 SN50,SN50 的工作浓度为 30 μM,再放入 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>+3% O<sub>2</sub>+92% N<sub>2</sub> 的三气培养箱内。

三组均在培养 0 h、0.5 h、2 h、12 h 后,800 r/min(离心半径 8 cm)离心 5 min,收集细胞培养液及巨噬细胞进行各项测定比较。

**1.4 MTT 法检测细胞的存活率** 用 5 mL MTT 溶剂溶解 25 mg MTT,配制成 5 mg/mL 的 MTT 溶液,分装后放置于 -20 ℃ 避光保存。于 96 孔反应板上每孔加入 100 μL 约 10<sup>4</sup> 个细胞、MTT 溶液 100 μL,37 ℃ 继续孵育 4 h 后去除上清液。在酶标仪上选择 490 nm 检测波长,并用 680 nm 为参考波长,测定各孔的吸光值(OD)。按以下公式计算细胞存活率:

$$\text{存活率} = \frac{\text{实验孔 OD} - \text{空白孔 OD}}{\text{对照孔 OD} - \text{空白孔 OD}} \times 100\%$$

**1.5 TNF-α 的检测** 用 ELISA 法检测正常对照组、氧糖剥夺组、氧糖剥夺+SN50 处理组的巨噬细胞培养液中 TNF-α 的表达情况,按说明书操作并计算浓度。

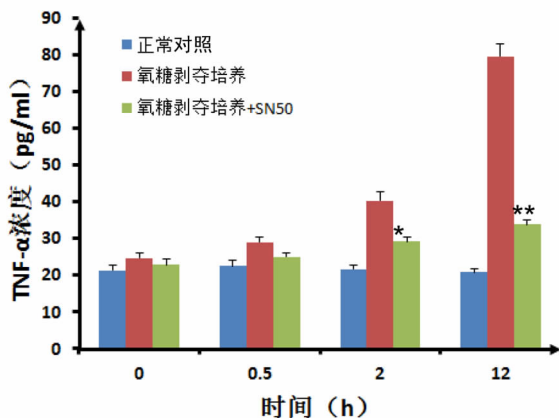
**1.6 统计学处理** 检测数据使用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。定量数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )

表示,成组设计多个样本均数比较采用 One-way ANOVA 方差分析,两样本间均数比较用 *t* 检验;定性资料以率(%)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。图表制作使用 OriginPro 7.0 软件。

## 2 结果

**2.1 MTT 法检测的细胞存活率** 在氧糖剥夺条件下培养,经过 SN50 处理与未经 SN50 处理的相比较,2 h 及 12 h 的细胞存活率明显上升,经过 SN50 处理的细胞存活率分别为(90±7)%和(84±7)%,未经 SN50 处理的细胞存活率分别为(73±4)%和(51±3)%,两组同时点比较差异均有统计学意义(分别为 *P* < 0.05, *P* < 0.01)。

**2.2 SN50 处理后的 TNF-α 表达** 本文观察到在氧糖剥夺条件下培养,0.5 h、2 h 后 TNF-α 表达逐渐升高;在培养 12 h 后,TNF-α 表达有明显的增高。同样在氧糖剥夺条件下,经过 SN50 处理后,TNF-α 的表达上调幅度明显变小,其中 2 h 与未经 SN50 处理的相比差异有统计学意义(*P* < 0.05,图 1),到 12 h 这种差异更加明显(*P* < 0.01)。



与氧糖剥夺培养组比较,\**P* < 0.05,\*\**P* < 0.01

图 1 三组巨噬细胞培养液中 TNF-α 的表达情况

## 3 讨论

在缺血再灌注损伤过程中,各种细胞因子或炎症因子都会参与其中,有研究表明,在脑部的缺血再灌注损伤后,脑内的 TNF-α 在组织缺血再灌注后的表达会明显增加<sup>[5]</sup>;TNF-α 可激活组织内的巨噬细胞、内皮细胞及小胶质细胞产生各种炎性代谢物,持续炎症反应<sup>[6]</sup>。TNF-α 同时还可促进白介素-1(interleukin-1, IL-1)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)及粒细胞-单核细胞集落刺激因子,产生相互协同的

炎性作用<sup>[7]</sup>;TNF- $\alpha$  对毛细血管有非常直接的作用,不仅可导致微小动脉痉挛,而且还能增加毛细血管的通透性,加重外周白细胞的浸润,同时 TNF- $\alpha$  还可导致内皮细胞的损伤<sup>[8]</sup>。

在正常情况下,NF- $\kappa$ B 是以无活性的状态存在于细胞质中。当细胞受细胞外信号(如细胞因子、病毒、紫外线、氧自由基等)刺激后,I $\kappa$ B 激酶复合体(I $\kappa$ B kinase,IKK)活化后将 I $\kappa$ B 磷酸化,使 NF- $\kappa$ B 暴露了核定位序列,此时蛋白酶迅速降解磷酸化的 I $\kappa$ B,而游离的 NF- $\kappa$ B 会快速移位至细胞核内,与特异性  $\kappa$ B 的序列结合,诱导相关的基因产生转录<sup>[9]</sup>;已有许多研究报道,NF- $\kappa$ B 与缺血再灌注损伤有相当密切的关系,其可以诱导多种细胞因子或炎症因子的表达增加<sup>[10-12]</sup>。NF- $\kappa$ B 还能调控其他与血管发生有关的基因,包括编码 TNF- $\alpha$ 、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)以及胞间黏附分子-1(ICAM-1)的基因<sup>[12]</sup>等。也就是说这些因子由 NF- $\kappa$ B 调控,同时又可激活 NF- $\kappa$ B 而形成正反馈,使得缺血再灌注的损伤加剧,NF- $\kappa$ B 与 TNF- $\alpha$  两者之间存在有相互协调或是相互促进的作用。TNF- $\alpha$  由于在组织和细胞炎症损伤中起着相当重要的作用,所以常常被作为组织和细胞炎症损伤及其严重程度的重要观察指标<sup>[13]</sup>。本实验中,在氧糖剥夺条件下,经过了 SN50 处理后,巨噬细胞 TNF- $\alpha$  的表达上调幅度明显变小,与未经 SN50 处理的相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ );而且 SN50 处理后的细胞存活率与未处理的相比差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ )。SN50 作为一种可以穿过细胞膜的 NF- $\kappa$ B 抑制性蛋白肽类,特异性好,无明显的毒副作用,可以阻断 NF- $\kappa$ B 所介导的细胞信号的传导通路。根据 SN50 对 TNF- $\alpha$  mRNA 和蛋白水平的作用效果具有的一致性<sup>[14]</sup>,本文认为 SN50 主要是通过抑制 NF- $\kappa$ B 核的移位干扰了 TNF- $\alpha$  的基因转录而导致其分泌的蛋白量降低。

眼部的缺血再灌注损伤性疾病非常多见,目前针对其发病机制的实验研究很多,形成各种各样的学说,有氧自由基学说、一氧化氮学说、钙通道学说、炎症反应学说、兴奋性氨基酸学说等等,但是还没有明确真正的发病机制。本研究从分子生物学的角度探讨发病机制及治疗对策,通过建立模拟缺血再灌注损伤的体外模型,虽然可在细胞水平研究取得一些比较理想的结果,然而由于实验本身具非整体性,

细胞在体外培养时具有形态、理化因素的差异,体外的实验结果还需结合动物实验模型进行整体分析研究。

## 【参考文献】

- [1] Kloner RA. Does reperfusion injury exist in humans[J]. J Am Coll Cardiol,1993,21(2):537-545.
- [2] Kern TS,Miller CM,Du Y,et al. Topical administration of nepafenac inhibits diabetes- induced retinal microvascular disease and underlying abnormalities of retinal metabolism and physiology[J]. Diabetes,2007,56(2):373-379.
- [3] 游志鹏,赵菊莲,汪昌运. 核转录因子- $\kappa$ B 及肿瘤坏死因子- $\alpha$  在大鼠视网膜缺血再灌注损伤中的表达及 NAC 对其表达的影响及对视网膜的保护作用[J]. 中国现代医学杂志,2006(22):3438-3440.
- [4] Lin YZ,Yao SY,Veach RA,et al. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence[J]. J Biol Chem,1995,270(24):14255-14258.
- [5] Liu T,Clark RK,McDonnell PC,et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in ischemic neurons [J]. Stroke, 1994, 25 (7): 1481-1488.
- [6] 李 茜,陈兴东,段满林. 急性脑缺血对机体免疫系统的影响[J]. 医学研究生学报,2013,26(6):654-657.
- [7] 白小武,嵇 武,丁博文,等. 大黄素对肠黏膜屏障损伤的保护作用及机制研究[J]. 东南国防医药,2012,14(1):12-15.
- [8] Barone FC,Atvin B,White RF,et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : a mediator of focal ischemic brain injury[J]. Stroke,1997,28(6):1233-1244.
- [9] Hayden MS,Ghosh S. NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions[J]. Genes Dev,2012,26(3):203-234.
- [10] Chen YG,Zhang C,Chiang SK,et al. Increased nuclear factor - $\kappa$ B P65 immunoreactivity following retinal ischemia and reperfusion injury in mice[J]. J Neurosci Res,2003,72(1):125-131.
- [11] Wang J,Jiang S,Kwong JM,et al. Nuclear factor- $\kappa$ B P65 and up-regulation of interleukin-6 in retinal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Brain Res,2006,1081(1):211-218.
- [12] 丁博文,嵇 武,白小武,等. 大黄素对肠上皮细胞损伤的保护作用及机制研究[J]. 东南国防医药,2012,14(3):199-202.
- [13] Baeuerle PA,Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system[J]. Annu Rev Immunol,1994,12:141-179.
- [14] 游志鹏,姜德咏,李国栋. NF- $\kappa$ B 诱导 TNF- $\alpha$  在大鼠视网膜缺血再灌注损伤中的表达及 PDTC 对其表达的影响[J]. 眼科,2004(3):178-181,193.

(收稿日期:2014-05-04;修回日期:2014-06-15)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)