

· 论著 ·

# 核因子 $\kappa$ B 在烧伤血清诱导内皮细胞 细胞间黏附分子 1 表达中的作用

李志清 黄跃生 杨宗城 王甲汉



**【摘要】** 目的 探讨核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 在烧伤血清诱导内皮细胞 (EC) 分泌细胞间黏附分子 (ICAM)1 中的作用。方法 人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 培养后, 分别用正常人血清 (对照组)、烧伤患者血清 (烧伤血清组)、吡咯烷二硫代氨基甲酸盐 (PDTC) + 烧伤患者血清 (PDTC 组) 刺激。于刺激 0.5、1.0、2.0、4.0 h 时采用电泳迁移率分析法测定 HUVEC NF- $\kappa$ B 的活性; 流式细胞术检测刺激 3.0、6.0、12.0、24.0 h 时 HUVEC 膜表面 ICAM-1 的表达。结果 刺激后烧伤血清组、PDTC 组细胞 NF- $\kappa$ B 活性均明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 1.0 h 时达峰值 [(21.03  $\pm$  4.87)、(7.44  $\pm$  0.60)  $\times 10^4$  积分灰度值], 以后逐渐降低; PDTC 组明显低于烧伤血清组 ( $P < 0.01$ )。刺激后烧伤血清组、PDTC 组 ICAM-1 的表达均增加, 刺激 12.0 h 时达峰值 (平均荧光密度各为 327  $\pm$  37、142  $\pm$  31), 与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); PDTC 组刺激 12.0、24.0 h 时低于烧伤血清组 ( $P < 0.01$ )。结论 烧伤血清通过活化 NF- $\kappa$ B, 从而启动 EC 对黏附分子的合成和释放, 提示 NF- $\kappa$ B 在烧伤血清诱导 EC 分泌黏附分子过程中起重要作用。

**【关键词】** 烧伤; 内皮细胞; NF- $\kappa$ B; 细胞间黏附分子 1

**The role of nuclear factor- $\kappa$ B in the burn serum-induced expression of intercellular adhesion molecules-1 in endothelial cells** LI Zhi-qing\*, HUANG Yue-sheng, YANG Zong-cheng, WANG Jia-han. \*Department of Burns, Southern Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, P. R. China  
Corresponding author: HUANG Yue-sheng, 400038, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Third Military Medical University, Email: yshuang@public.cta.cq.cn, Tel: 023-68754173

**【Abstract】** Objective To explore the role of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in the burn serum induced expression of intercellular adhesion molecules-1 (ICAM-1) in endothelial cells. Methods Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured in vitro and divided into control (with normal serum stimulation), burn serum (B, with burn serum stimulation) and PDTC (with burn serum and PDTC stimulation) groups. The NF- $\kappa$ B activity in endothelial cells was determined with electrophoretic mobility shift assay (EMSA) at 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 post-stimulation hour (PSH). The expression of ICAM-1 at 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 PSH was detected by flow cytometry. Results The NF- $\kappa$ B activity in endothelial cells in burn serum group and PDTC group were markedly higher than that in control group ( $P < 0.01$ ), and it reached the peak at 1.0 PSH [(21.03  $\pm$  4.87), (7.44  $\pm$  0.60)  $\times 10^4$  A], respectively, then gradually decreased. But it was obviously lower in PDTC group than that in burn serum group ( $P < 0.01$ ). The expression of ICAM-1 was gradually increased in both burn serum group and PDTC group, reaching the peak level at 12.0 PSH [(327  $\pm$  37), (142  $\pm$  31) mean fluorescence intensity], respectively, which were significantly higher than that in control group ( $P < 0.01$ ). But it was evidently lower in PDTC group than that in burn serum group at 12.0 and 24.0 PSH ( $P < 0.01$ ). Conclusion Burn serum can initiate the synthesis and release of adhesion molecules in endothelial cells through activation of NF- $\kappa$ B, indicating that NF- $\kappa$ B plays an important role in the process of burn serum induced endothelial secretion of adhesion molecules.

**【Key words】** Burns; Endothelial cells; NF-kappa B; Intercellular adhesion molecules-1

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目 (30125040); 国家重点基础研究发展规划资助项目 (G1999054202)

作者单位: 510515 广州, 南方医科大学南方医院烧伤科 (李志清、王甲汉); 第三军医大学西南医院全军烧伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室 (黄跃生、杨宗城)

通信 (讯) 作者: 黄跃生, 400038, 第三军医大学西南医院全军烧伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, Email: yshuang@public.cta.cq.cn, 电话: 023-68754173

严重烧伤后内皮细胞 (endothelial cells, EC) 激活可释放多种细胞因子, 加剧组织细胞损伤和脏器功能障碍<sup>[1]</sup>。核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 是 EC 表达和释放细胞因子的关键转录调节因子<sup>[2]</sup>。有研究表明, 烧伤血清可激活 EC 并诱导其黏附分子的表达和释放, 损伤 EC<sup>[3]</sup>。本研究旨在了解 NF- $\kappa$ B 是否在烧伤血清刺激 EC 表达和分泌黏附分子过程中起作用。

### 材料与方 法

1. 主要试剂与设备: RPMI 1640 培养基(美国 Gibco-BRL 公司), 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的抗小鼠 IgG、小鼠抗人细胞间黏附分子 (ICAM) 1 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐 (PDTC)、考马斯亮蓝 G-250 (美国 Sigma 公司)。硝酸纤维膜(美国 GIB 公司), 凝胶电泳迁移分析 (EMSA) 试剂盒(美国 Promega 公司),  $\gamma$ -<sup>32</sup>P 腺苷三磷酸(北京亚辉生物医学工程公司), 电泳仪、电转仪、干胶仪、真空泵、流式细胞仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2. 人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 培养: 取健康产妇产后 3 h 内脐带(产妇知情同意), 用 2.5 g/L 的胰蛋白酶分离 HUVEC。将 HUVEC 以  $2 \times 10^5$  /ml 接种于 6 孔培养板中, 于 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 待细胞融合成单层后使用。

3. 烧伤血清收集: 选择笔者单位烧伤患者 7 例, 其中男 5 例, 女 2 例, 年龄 15 ~ 50 岁, 烧伤总面积为 30% ~ 80% TBSA, 均为 III 度。于伤后 1 ~ 2 d 抽取患者外周静脉血分离血清, 灭活补体后, -20 ℃ 保存, 使用前与 RPMI 1640 培养基按 1:5 体积比混合。另取 7 例健康志愿者外周血清, 与 RPMI 1640 培养基按相同比例后混合作为对照。

4. 实验分组: 实验分为对照组(正常血清刺激)、烧伤血清组(烧伤血清刺激)、PDTC 组(将 PDTC 加入烧伤血清中, 使其终浓度为 100 μmol/L, 1 h 后用以刺激 HUVEC)。

5. 检测指标: (1) 采用 EMSA 法检测刺激前及刺激 0.5、1.0、2.0、4.0 h 时各组 HUVEC NF-κB 活性, 操作按试剂盒说明书进行。(2) ICAM-1 表达: 各组细胞刺激前及刺激 3.0、6.0、12.0、24.0 h 时, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 3 ~ 7 min, 制成  $1 \times 10^6$  /ml 细胞悬液。加入小鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体, 并用小鼠 IgG 作对照, 4 ℃ 孵育 30 min。离心, 弃上清, 洗涤 2 次。加入 FITC 标记的抗小鼠 IgG, 4 ℃ 孵育 30 min。离心洗涤 2 次, 用流式细胞术检测 HUVEC ICAM-1 的表达。

6. 统计学处理: 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 Excel 统计分析软件行 *t* 检验。

### 结 果

1. HUVEC NF-κB 的活性: 刺激后烧伤血清组、PDTC 组 HUVEC NF-κB 活性明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 伤后 1.0 h 达峰值, 以后逐渐降低。PDTC 组

各时相点明显低于烧伤血清组 ( $P < 0.01$ )。见图 1, 表 1。

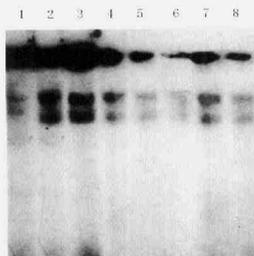


图 1 各组 HUVEC NF-κB 活化电泳图。条带 1 ~ 6 分别为对照组刺激前及烧伤血清组刺激 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 h; 条带 7、8 为 PDTC 组刺激 1.0、0.5 h

表 1 各组 HUVEC NF-κB 活性的变化 ( $\times 10^3$  积分灰度值,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	刺激前	刺激时间(h)			
			0.5	1.0	2.0	4.0
对照组	35	0.85 ± 0.06	0.97 ± 0.12	0.88 ± 0.09	1.03 ± 0.15	0.91 ± 0.08
		0.85 ± 0.06	16.82 ± 3.07*	21.03 ± 4.87*	12.64 ± 1.21*	12.64 ± 0.55
PDTC 组	21	0.85 ± 0.06	6.95 ± 0.82**	7.44 ± 0.60**	—	—

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与烧伤血清组比较, #  $P < 0.01$ ; “—”表示未检测

2. HUVEC ICAM-1 的表达: 烧伤血清组、PDTC 组 HUVEC 接受刺激后 ICAM-1 表达均增加, 12.0 h 时达峰值(平均荧光密度各为  $327 \pm 37$ 、 $142 \pm 31$ ), 与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。刺激 12.0、24.0 h 时, PDTC 组较烧伤血清组低 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 各组 HUVEC ICAM-1 的表达水平 (平均荧光密度,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	刺激前	刺激时间(h)			
			3.0	6.0	12.0	24.0
对照组	35	86 ± 9	87 ± 11	89 ± 11	102 ± 12	98 ± 10
		86 ± 9	134 ± 20*	175 ± 29*	327 ± 37*	315 ± 42*
PDTC 组	21	86 ± 9	126 ± 28*	139 ± 33*	142 ± 31**	133 ± 26**

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与烧伤血清组比较, #  $P < 0.01$

### 讨 论

NF-κB 是一种多效转录调节因子, NF-κB/核因子抑制蛋白 (IκB) 信号通路调控多因素刺激条件下 EC 细胞因子的转录<sup>[1,3]</sup>。严重烧伤后 EC 激活或受损, 并释放多种细胞因子, 是脏器组织损害发生的基

本病理过程。为进一步了解烧伤后 EC 释放细胞因子的机制,笔者用烧伤血清作为 HUVEC 的刺激因素,观察到 NF-κB 参与了烧伤血清作用下 HUVEC ICAM-1 的表达。ICAM-1 是 EC 结构表达和活化后表达增多的一种黏附分子,通过与整合素家族成员 (CD11/CD18) 等结合,介导白细胞与 EC 黏附、渗出、到达受损组织或感染部位<sup>[3]</sup>。笔者以往的研究结果显示,体外培养的 HUVEC 在烧伤血清刺激后 IκB 即迅速发生降解,刺激 1.0 h 时达高峰,与烧伤血清刺激 EC 后 P50/P65 发生核移位高峰的时间一致<sup>[2]</sup>。本研究结果表明,在烧伤血清刺激 0.5 h 时 HUVEC NF-κB 活性即明显升高,1.0 h 时达高峰。说明烧伤血清刺激 HUVEC 后, IκB 的降解、NF-κB 的核移位与 NF-κB 活性升高是相互偶合的。在烧伤血清刺激 HUVEC 前给予具有抗氧化特性、能抑制 NF-κB 活化的 PDTC,可抑制 NF-κB 活化以及 ICAM-1 的表达增高,进一步证实 NF-κB 参与了烧伤血清刺激条件下 HUVEC ICAM-1 的表达。而且既往的研究也表明, PDTC 能有效抑制 EC H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的产生、IκB 降解、NF-κB 活化,从而抑制 ICAM-1、血管细胞黏附分子 (VCAM) 1、E 选择素等的分泌,减轻脏器微血管的损害<sup>[6]</sup>。PDTC 通过抗氧化作用只能部分抑制烧伤血清刺激 EC 后 NF-κB 活化,但不能

完全抑制 ICAM-1 表达的增高,提示 NF-κB/IκB 是烧伤血清作用条件下 EC 表达 ICAM-1 等细胞因子转录调控的参与者,而非惟一的转录调节因子。陈旭林等<sup>[7]</sup>的研究显示,激活蛋白 1 也参与了烧伤后肺组织 EC 的损伤。如何有效、适当地调控烧伤后 EC 活化及其对细胞因子的表达,尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 杨宗城. 加强对烧伤后缺血缺氧性损害的研究. 中华烧伤杂志, 2003, 19: 132 - 133.
- 2 李志清, 黄跃生, 杨宗城. 烧伤血清对内皮细胞核因子-κB 核移位的影响. 中华烧伤杂志, 2002, 18: 265 - 267.
- 3 李志清, 杨宗城, 罗向东, 等. 烧伤血清对中性粒细胞 CD11/CD18 和内皮细胞 ICAM-1 表达的变化. 第三军医大学学报, 1997, 19: 101 - 104.
- 4 顾大勇, 马布仁, 王晓华, 等. LPS 直接诱导对肺微血管内皮细胞核因子 κB 活化的影响. 第三军医大学学报, 2004, 26: 310 - 313.
- 5 Palmethofer A, Robson SC, Nehls V. Lysophosphatidic acid activates nuclear factor kappa B and induces Proinflammatory gene expression in endothelial cells. Thromb Haemost, 1999, 82: 1532 - 1537.
- 6 Liu SF, Ye XB, Malik AB. Pyrrolidine dithiocarbamate prevents IκB degradation and reduces microvascular injury induced by lipopolysaccharide in multiple organs. Molecular Pharmacol, 1999, 55: 658 - 667.
- 7 陈旭林, 夏照帆, 韦多, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶在烧伤大鼠急性肺损伤中的作用机制. 中华烧伤杂志, 2004, 20: 262 - 264.

(收稿日期: 2005 - 11 - 25)  
(本文编辑: 张红)

· 消息 ·

《中国神经再生研究(英文版)》征稿及征订启事

2005 年 9 月经国家新闻出版总署批准(新出报刊[2005]1029 号),《中国神经再生研究(英文版)》(CN11 - 5422/R, ISSN 1673 - 5374)于国内外公开发行人。本刊为月刊, A4 开本, 96 页/期, 四封为 230 g 进口铜版纸塑封膜, 内文为 105 g 进口铜版纸, 印刷精美。

本刊宗旨为关注国际神经再生研究方面的热点和重大应用性课题, 跟踪国际神经再生研究方面的高科技前沿成果。稿件特色为及时报道神经再生研究领域具有前瞻性、创造性和较高学术水平的基础研究、应用基础研究以及相关临床研究。从投稿至接到处理意见的时间为 30 d。通常作者修回到发表的时间为 90 d, 欢迎投稿。

欢迎订阅本刊。国内订阅: 邮发代号 8 - 585; 本刊订阅: 沈阳 1234 邮政信箱, 邮编 110004。投稿电邮: sjzs101@163.com; sjzs102@163.com。咨询电邮: sjzs100@163.com。电话: + 86 24 23381085, 传真: + 86 24 23394178。更多信息详见 www.sjzsyj.com。

《中国组织工程研究与临床康复》征稿及征订启事

2007 年《中国组织工程研究与临床康复》(原《中国临床康复》)杂志将工作重点放在以下 5 个领域: 种子细胞研究、组织构建研究、生物材料研究、临床应用研究、康复工程研究, 每周 1 刊。

本刊征稿内容: 报道上述研究领域的热点、焦点、难点问题及其创新技术、创新方法, 探讨其新机制和新思路。内容突出前瞻性、创新性、科学性、实用性。惟能确实反映出该领域研究的最高水平, 力求每篇文章都清楚阐述与他人、他篇的不同之处。

本刊一般稿件修回后 6 个月内出版, “绿色特快通道”承诺修回稿件 3 个月内出版。咨询电邮: szb100@zglckf.com; 电话: 024 - 23384352、23389106; 传真: 024 - 23381085。投稿电邮: kf23385083@sina.com; kf22838105@sina.com。国内订阅: 邮发代号 8 - 584; 本刊订阅: 辽宁省沈阳 1200 邮政信箱, 邮编 110004。更多信息详见 www.zglckf.com。