

益赛普对脓毒症大鼠心肌损伤与炎症因子表达的影响

李登辉 胡德林 李亚南 台运成 方林森 余又新

摘要 目的 研究早期应用益赛普对脓毒症大鼠心肌损伤及炎症因子表达的影响,并就其对心肌损伤机制的影响进行初步探讨。方法 108只雌性清洁级SD大鼠随机分为假手术组、脓毒症组与治疗组。假手术组行盲肠探查术,脓毒症组和治疗组两组行盲肠结扎穿孔术制作脓毒症模型。治疗组加用益赛普以干预,均在3、9、24、36、48、72 h时相点留取标本,每时相点6只大鼠。ELISA法检测大鼠血清心肌肌钙蛋白(cTnI)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)浓度,Western blot法检测心肌核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65)的表达,数据结果采用析因设计方差分析。结果 ①脓毒症组与治疗组血清cTnI、TNF- α 、IL-1、NF- κ B p65水平均高于假手术组($P < 0.05$),两组浓度均于3 h达峰值,而后逐渐下降。治疗组每个时相点均低于脓毒症组;②血清TNF- α 、

IL-1浓度均与血清cTnI表达呈显著正相关性。结论 脓毒症大鼠心肌早期发生损伤,应用益赛普能够降低血清TNF- α 、IL-1的释放及心肌组织NF- κ B p65的表达,减少机体炎症反应,起到保护心脏的作用。

关键词 益赛普;脓毒症;心肌损伤;肌钙蛋白I;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素-1;核转录因子- κ B p65

中图分类号 R 631; R 392

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)07-0925-04

心肌损伤是脓毒症常见的并发症,发生率约50%^[1]。其作用机制尚未明确,研究^[2]表明大量炎性介质的释放是造成心肌等损伤的主要原因之一。益赛普目前临床上主要应用于中度及重度活动性类风湿关节炎、成人中度至重度斑块状银屑病、活动性强直性脊柱炎等的治疗。但其在脓毒症大鼠心肌损伤的保护作用方面研究甚少,该研究通过对盲肠穿刺所致脓毒症大鼠模型使用益赛普,观察脓毒症大鼠早期血清心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTnI)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、白

2015-04-24 接收

基金项目:安徽省卫生厅科研基金(编号:09A067)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院烧伤科,合肥 230032

作者简介:李登辉,男,硕士研究生;

胡德林,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: hdl0522@163.com

Establishment of irradiation induced heart injury in C57 mice model and identification of serum marker

Fu Tianxiao¹, Zhou Juying¹, Jiao Yang²

(¹Dept of Oncological Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of Soochow University,

²School of Radiation Medicine and Public Health of Soochow University, Suzhou 215006)

Abstract Objective To establish and investigate C57BL/6 mice model of radiation induced heart injury and serum marker. **Methods** Twenty eight female C57BL/6 mice were randomly divided into 3 groups: normal group ($n = 4$), 18 Gy radiation therapy group ($n = 12$), 25 Gy radiation therapy group ($n = 12$). The mice were weighed every week. Respectively, 0, 8 and 16 weeks after irradiation, the pathological changes of myocardial tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and made pathological score. Inferior vena cava blood was collected to take cardiac troponin I (cTnI) test. **Results** Compared with the normal group, the weight of radiation group went down first then went up slowly. The myocardial tissue from mice had obvious histopathological changes. Acute inflammation was the main change in the early days. At the late stage, progressive fibrosis was the main characteristic. With the increase of the dose, the inflammatory reaction and fibrosis degree had aggravated, pathological changes had occurred earlier. cTnI showed a trend of higher performance over time, and had a correlation with pathology. **Conclusion** We successfully established radiation induced myocardial injury model. As a noninvasive serum marker, cTnI can be used as the evaluation standard of radiation induced myocardial injury animal model.

Key words radiation induced heart injury; animal model; evaluation method; cardiac troponin I

细胞素-1 (interleukin-1, IL-1) 的释放以及真核细胞核转录因子 p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65) 的表达情况, 观察益赛普对脓毒症大鼠炎症因子的表达及心肌损伤的影响, 以寻找防治脓毒症心肌损伤的新方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 108 只 10~12 周清洁级 SD 大鼠, 雌性, 体重 (190 \pm 20) g, 购自安徽医科大学动物实验中心。随机分为 3 组: 假手术组、脓毒症组、治疗组。每组分为 3、9、24、36、48、72 h 共 6 个时相点, 每时相点 6 只大鼠。

1.2 动物模型制作 大鼠自由饮水、进食, 适应性饲养 1 周, 实验前禁食过夜, 自由饮水, 其中假手术组行盲肠探查术, 脓毒症组、治疗组按文献^[3]报道的方法行盲肠结扎穿孔术 (cecal ligation and puncture, CLP) 复制脓毒症动物模型。治疗组在手术后立即从颈外静脉注入益赛普 (上海中信国健药业股份有限公司) 水溶液 2 ml/kg (益赛普浓度为 1.25 mg: 1 ml 生理盐水), 脓毒症组从颈外静脉注入生理盐水 2 ml/kg。3 组均在术后立即腹腔注射生理盐水 5 ml 预防休克。

1.3 标本的留取 分别在术后 3、9、24、36、48、72 h 各时相点在大鼠麻醉后从腹主动脉留取血标本约 5~6 ml, 置于普通试管中, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存 2 h。使用离心机 4 000 r/min 常温离心 15 min, 加样器取 3 份上清液置于 EP 管中, 每份样品 200 μ l, 置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存; 大鼠处死后, 迅速打开胸腔自心脏尖部取黄豆大小的标本。生理盐水冲洗, 液氮速冻, -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 标本的检测

1.4.1 血清 cTnI 水平检测 取已制备的样品冻融后, 采用双抗体夹心 ELISA 法测定血清标本中 cTnI 水平, cTnI ELISA 试剂盒购自南京基蛋生物技术有限公司, 操作严格按说明书执行。

1.4.2 TNF- α 、IL-1 水平检测 取已制备的样品冻融后采用双抗体夹心 ELISA 法测定血清标本中 TNF- α 、IL-1 水平, TNF- α 、IL-1 ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司, 操作严格按说明书执行。

1.4.3 NF- κ B p65 水平检测 取 80 mg 心肌组织, 采用 Western blot 法检测, 以 β -actin 为内参照, 加组织细胞裂解液匀浆, 提取总蛋白, BCA 法定量, SDS-PAGE 电泳, 半干转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入 1

: 500 兔抗大鼠 NF- κ B p65 多克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜, 加入 1: 50 000 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗, 化学发光显影, 采用凝胶图像分析系统行灰度扫描分析, 以目的蛋白与 β -actin 灰度值比值分析结果。NF- κ B p65 多克隆抗体一抗购自武汉博士德公司, 操作严格按说明书执行。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据采取析因设计方差分析, 相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 血清 cTnI 水平变化 脓毒症组与治疗组血清 cTnI 水平在 CLP 术后较假手术组均增高 ($P < 0.05$), 两组均在 3 h 达峰值, 随后呈下降趋势 ($P < 0.05$)。治疗组下降较脓毒症组更明显, 从 3 h 至 72 h 均明显低于脓毒症组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 cTnI 检测结果 ($n = 36$, μ g/ml $\bar{x} \pm s$)

时间 (h)	假手术组	脓毒症组	治疗组
3	43.38 \pm 3.16	333.64 \pm 3.47*	228.33 \pm 3.64*#
9	38.25 \pm 2.68	273.59 \pm 3.16*	167.19 \pm 2.88*#
24	34.72 \pm 3.79	210.22 \pm 4.28*	131.27 \pm 2.97*#
36	33.77 \pm 4.99	171.07 \pm 3.29*	94.13 \pm 3.31*#
48	30.88 \pm 2.16	126.58 \pm 4.17*	74.97 \pm 3.05*#
72	28.78 \pm 4.54	92.85 \pm 3.53*	55.32 \pm 3.58*#

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与脓毒症组比较: # $P < 0.05$; 处理因素主效应: $F = 21.543$, $P < 0.01$; 时间因素主效应: $F = 4.422$, $P < 0.05$; 两者交互作用: $F = 30.598$, $P < 0.01$

2.2 血清 TNF- α 、IL-1 水平的变化 脓毒症组与治疗组血清 TNF- α 、IL-1 水平在 CLP 术后较假手术组均增高 ($P < 0.05$), 两组在 3 h 达峰值, 随后均呈下降趋势 ($P < 0.05$)。治疗组比脓毒症组下降更明显, 从 3 h 至 72 h 治疗组均明显低于脓毒症组 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 TNF- α 、IL-1 与 cTnI 的相关性分析 TNF- α 与 cTnI 呈显著正相关性 ($r = 0.993$, $P = 0.000$); IL-1 与 cTnI 呈显著正相关性 ($r = 0.980$, $P = 0.000$)。

2.4 心肌组织 NF- κ B p65 蛋白检测结果 治疗组与脓毒症组 CLP 术后 3 h NF- κ B p65 蛋白表达水平均高于假手术组 ($P < 0.05$), 随后均有下降趋势, 治疗组下降幅度较脓毒症组更快, 在 24、36、48 h 治疗组 NF- κ B p65 蛋白表达水平均低于脓毒症组, 至 72 h 两组差异无统计学意义。见图 1。

表2 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 检测结果($n=36$ pg/ml $\bar{x} \pm s$)

时间(h)	TNF- α			IL-1		
	假手术组	脓毒症组	治疗组	假手术组	脓毒症组	治疗组
3 h	50.92 \pm 3.42	385.72 \pm 5.96*	257.62 \pm 5.56*#	39.95 \pm 1.68	271.21 \pm 7.82*	179.23 \pm 2.51*#
9 h	48.23 \pm 2.60	304.81 \pm 6.45*	210.11 \pm 4.53*#	32.15 \pm 3.59	230.05 \pm 6.50*	153.78 \pm 2.54*#
24 h	40.73 \pm 4.51	265.03 \pm 11.81*	169.35 \pm 2.99*#	30.44 \pm 3.46	174.53 \pm 23.39*	129.8 \pm 5.71*#
36 h	34.24 \pm 1.24	205.28 \pm 5.59*	130.49 \pm 2.43*#	30.15 \pm 4.26	146.43 \pm 3.53*	103.37 \pm 3.79*#
48 h	32.71 \pm 5.10	149.24 \pm 1.30*	91.29 \pm 3.34*#	28.18 \pm 3.55	115.96 \pm 2.04*	74.37 \pm 2.61*#
72 h	32.65 \pm 6.73	149.35 \pm 11.54*	90.45 \pm 42.75*#	28.10 \pm 4.80	79.31 \pm 3.73*	51.72 \pm 1.70*#

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与脓毒症组比较: # $P < 0.05$; TNF- α 处理因素主效应: $F = 32.497$ $P < 0.01$; 时间因素主效应: $F = 4.911$ $P < 0.05$; 两者交互作用 $F = 41.210$ $P < 0.01$ 。IL-1 处理因素主效应: $F = 24.374$ $P < 0.01$; 时间因素主效应: $F = 4.262$ $P < 0.05$; 两者交互作用: $F = 39.443$ $P < 0.01$

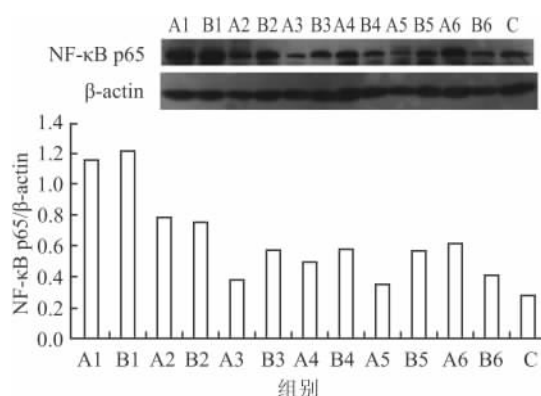


图1 Western blot 法检测各组大鼠心肌组织

NF- κ B p65 蛋白的表达水平

A: 治疗组; B: 脓毒症组; C: 假手术组; 1: 术后 3 h; 2: 术后 9 h; 3: 术后 24 h; 4: 术后 36 h; 5: 术后 48 h; 6: 术后 72 h

3 讨论

脓毒症是机体在感染因素作用下失控的自我放大、破坏的全身炎症反应综合征,也是严重创伤、烧伤、休克、大手术和感染后常见并发症及死亡的重要原因,发病急、进展迅速、病死率高。CLP 是经典的复制脓毒症动物模型方法之一,通过肠内容物污染腹腔,造成弥漫性腹膜炎,诱发机体全身破坏性炎症反应。可以通过对脓毒症大鼠炎症因子表达情况的观察,来探寻益赛普对脓毒症大鼠的影响。本实验结果显示,治疗组、脓毒症组血清 cTnI 水平在 CLP 术后均明显高于假手术组,且治疗组的 cTnI 水平低于脓毒症组。cTnI 作为一种心肌调节蛋白,被认为是反映心肌损伤程度高敏感、高特异的“金标准”^[4]。实验中治疗组及脓毒症组 cTnI 水平的升高,表明脓毒症时确有心肌损伤,且使用益赛普后可以减轻心肌的损伤情况。实验中治疗组与脓毒症组血清 TNF- α 及 IL-1 水平在 CLP 术后升高,均明显高于假手术组。可能是在脓毒症发生时,体内内毒素大

量增加,刺激了炎症细胞因子的大量释放。TNF- α 及 IL-1 均与 cTnI 呈高度相关性,可推断脓毒症时的心肌受损与 TNF- α 、IL-1 的大量释放有关。该实验结果与研究^[5]结果相近。在炎症反应中, TNF- α 具有始动作用, TNF- α 能诱导 IL-1 的产生和释放, IL-1 又可诱导 IL-6、TNF- α 等多种细胞因子的分泌,逐层引起连锁放大效应。脓毒症心肌细胞不仅是细胞因子攻击的目标,而且其又可分泌细胞因子,同样加重心肌损伤。因此可以通过减少脓毒症时炎症介质的释放来减轻心肌的损伤。治疗组使用益赛普降低了 TNF- α 、IL-1、cTnI 水平,减轻了心肌损伤。

研究^[6]表明, NF- κ B 作为心脏应激反应快速表达基因,转录产生的细胞因子可以直接引起血管内皮细胞和心肌细胞的损伤,各种心脏疾病都存在 NF- κ B 的激活,本实验中,无论是治疗组还是脓毒症组,均有其大量表达。NF- κ B 作为一种由 p65 和 p50 两个亚单位与抑制因子 I κ B 连接而成的三聚体复合物形式存在的重要转录因子^[7],其中 p65 亚基具有激活诱导基因转录表达的能力。在受到刺激后, NF- κ B p65 可自由从胞质向胞核转移,启动多种细胞因子基因(如 TNF- α 、IL-1)的转录和翻译过程,从而诱导炎症细胞的激活^[8]。实验中治疗组中 NF- κ B p65 表达要低于脓毒症组,表明使用益赛普可以减少 p65 的释放。NF- κ B 处于炎症反应细胞因子网络的中心环节,通过对其活化的抑制,可以从基因水平调控细胞因子的表达,减少炎症介质的释放。本实验结果表明使用益赛普可以降低炎症因子、NF- κ B p65 的表达,可能是益赛普与可溶性和跨膜的 TNF- α 特异性结合,竞争性地与 TNF 受体结合,降低 TNF- α 的生物活性^[9]。同时 TNF- α 可以激活 NF- κ B p65 的表达,形成正反馈,使用益赛普通过抑制 TNF- α 介导的 NF- κ B 信号转导,阻断多种炎症因子的活化与过度表达,减轻炎症反应。益赛普的使

用可以为寻求脓毒症大鼠心肌损伤的保护提供一种方法。

参考文献

- [1] 苏翠靖, 马志宇, 佟森, 等. p38 丝裂原激活蛋白激酶抑制剂对脓毒症早期大鼠心肌中炎症因子和细胞凋亡蛋白表达的影响[J]. 中国医科大学学报 2012 41(5): 422-6.
- [2] 毛燕飞, 孙璐璐, 廖兴志, 等. 舒血宁对脓毒症大鼠心肌的保护作用[J]. 第二军医大学学报 2011 32(2): 175-8.
- [3] Rittirsch D, Huber-Lang M S, Flierl M A, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. Nat Protoc, 2009 4(1): 31-6.
- [4] 汪兵, 吴继雄, 王晓晨, 等. 慢性心力衰竭患者血清心肌钙蛋白 I 与心脏结构功能的关系及其对预后的影响[J]. 安徽医科大学学报 2013 48(6): 652-5.
- [5] 宋均辉, 余又新, 方林森, 等. rhTNFR: Fc 对脓毒症大鼠血清中炎症介质的影响[J]. 安徽医科大学学报 2014 49(7): 1024-6.
- [6] Brown M, McGuinness M, Wright T, et al. Cardiac-specific blockade of NF- κ B in cardiac pathophysiology: differences between acute and chronic stimuli *in vivo* [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005 289(1): H466-76.
- [7] 李微微, 汪华学, 柴继侠. 脓毒症致大鼠急性肾损伤中炎症介质的变化及机制探讨[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2014 23(2): 159-64.
- [8] Choi Y K, Cho S G, Woo S M, et al. Saussurea lappa clark-derived costunolide prevents TNF- α -induced breast cancer cell migration and invasion by inhibiting NF- κ B activity [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013 2013: 936257.
- [9] 孙辉, 彭亚飞, 林伟, 等. 重组人肿瘤坏死因子受体抗体融合蛋白联合缺血后适应减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤[J]. 中国动脉粥样硬化杂志 2010 18(1): 47-51.

Influence of etanercept on myocardial injury and expression of inflammatory response in sepsis rats

Li Denghui, Hu Delin, Li Yanan, et al

(Dept of Burns, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the early effect of etanercept on myocardial injury mechanism through the early study of influence of etanercept on myocardial injury and expression of inflammatory response in sepsis rats. **Methods** 108 female SD rats were randomly divided into the sham operation group, the sepsis group and the treatment group. The sham operation group underwent exploratory surgery on cecum, while the sepsis group and the treatment group were produced in accordance with the CLP to establish sepsis model. Besides, the treatment group was injected with etanercept. Specimens of three groups were respectively taken at 3, 9, 24, 36, 48 and 72 h time points. Each time point had six rats. The concentrations of serum cTnI, TNF- α , serum IL-1 were detected by ELISA method. The expression of cardiac NF- κ B p65 was detected by Western blot. Data were processed with analysis of variance of factorial design. **Results** ① The concentrations of serum cTnI of sepsis group and treatment group peaked at 3 h, then progressively decreased, and they were higher than the concentrations of sham operation group ($P < 0.05$). The concentrations of treatment group were lower than the concentrations of sepsis group at each time point; ② The concentrations of serum TNF- α and IL-1 of sepsis group and treatment group peaked at 3 h, and then progressively decreased, and they were higher than the concentrations of sham operation group ($P < 0.05$). The concentrations of treatment group were lower than the concentrations of sepsis group at each time point; ③ The concentrations of serum TNF- α and IL-1 were significantly positively correlated with the concentration of cTnI; ④ The concentrations of NF- κ B p65 of sepsis group and treatment group peaked at 3 h, and then progressively decreased. They were higher than the concentrations of sham operation group ($P < 0.05$). The concentrations of treatment group were lower than the concentrations of sepsis group at each time point. **Conclusion** Early myocardial damage occurs in septic rats. Etanercept application can reduce serum TNF- α , IL-1 expression and the release of NF- κ B p65 of myocardial tissue, reducing the body's inflammatory response, and then protecting the heart.

Key words etanercept; sepsis; myocardial injury; cTnI; TNF- α ; IL-1; NF- κ B p65