

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.07.008

氯胺酮对脂多糖诱导人脐静脉内皮细胞核因子- κ B 表达的影响

高峰, 罗玉琳, 郁 葱, 吴雨佳

(重庆医科大学附属口腔医院麻醉科, 重庆 401147)

【摘要】目的:初步探讨胺酮对脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)作用下人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)核因子- κ B(Nuclear factor- κ B, NF- κ B)易位活化的影响及氯胺酮的抗炎效应。方法:HUVECs 分为 4 组:C 组(空白对照组)、L 组(加入 1 μ g/ml LPS)、KL1 组(3 μ g/ml 的氯胺酮+ 1 μ g/ml LPS)、KL2 组(30 μ g/ml 的氯胺酮+ 1 μ g/ml LPS)。采用免疫印记法(Western blot)、反转录聚合酶链式反应(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)和 HPIAS 2000 图象分析系统,测定 NF- κ B p65 亚基的易位活化表达。结果:KL1 组、KL2 组能抑制 LPS 作用下 HUVECs 内的 NF- κ B p65 易位表达($P<0.05$)。结论:LPS 可引起人脐静脉内皮细胞核因子- κ B 的表达,而氯胺酮可以抑制其作用,且其抑制作用可能与剂量呈正相关。氯胺酮的抗炎机制可能是在核因子- κ B 转录水平上实现的。

【关键词】氯胺酮;脂多糖;核因子- κ B;脐静脉

【中国图书分类法分类号】R614.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-05

Effects of Ketamine on lipopolysaccharide-induced nuclear factor- κ B expression of human umbilical vein endothelial cells

GAO Feng, LUO Yulin, YU Cong, WU Yujia

(Department of Anesthesiology, the Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of Ketamine on lipopolysaccharide(LPS)-induced translocation of nuclear factor- κ B(NF- κ B) in human umbilical vein endothelial cell nuclei and to explore its anti-inflammatory action. Methods: Human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) were divided into four groups: group C(blank control group), group L(1 μ g/ml LPS was added), group KL1(3 μ g/ml ketamine and 1 μ g/ml LPS were added) and group KL2(30 μ g/ml ketamine and 1 μ g/ml LPS were added). The translocation and expressions of NF- κ B p65 in endothelial cell nuclei were detected by Western blot, reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and image analysis system of HPIAS 2000. Results: The translocation and expression of NF- κ B p65 in endothelial cell nuclei induced by LPS were reduced in group KL1 and KL2. Conclusions: The translocation and expression of NF- κ B p65 in endothelial cell nuclei can be induced by LPS and Ketamine can suppress the activation. There are positive correlations between Ketamine concentration and its inhibitory effect. The anti-inflammatory effect of Ketamine may be achieved by the translocation of NF- κ B.

【Key words】Ketamine; lipopolysaccharide; nuclear factor- κ B; umbilical vein

核因子- κ B(Nuclear factor- κ B, NF- κ B)是一种重要的转录因子,参与了众多基因信号的调控,它的活化可诱导促炎性细胞因子的大量表达^[1-4]。一些学者相继证实,氯胺酮不但能够抑制肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor- α , TNF- α) mRNA 表达,以及白介素-6(Interleukin-6, IL-6)和白介素-8(Interleukin-8, IL-8)产生^[5],并对脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)性休克动物具有抗感染性休克和抗炎效

应^[6],然而氯胺酮抗炎效应的机制是否在于抑制NF- κ B 的转录活性,目前的研究结果并不一致^[7]。本实验采用 LPS 体外诱导人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)损伤,模拟炎症反应过程,通过检测 HUVECs NF- κ B 异位活化的变化,观察氯胺酮的影响,探讨其抗炎机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂材料

HUVECs 株购自中国科学院细胞生物学研究所上海细胞库,青链霉素溶液、胎牛血清、DMEM 购自 HyCLone 公司,

作者介绍:高峰(1981-),男,主治医师,硕士,

研究方向:口腔颌面外科麻醉。

通信作者:罗玉琳,女,教授,Email:luoyulin89@sina.com。

基金项目:重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:kj080308)。

DMSO、LPS 购自 Sigma 公司,胰蛋白酶购自 GIBCO 公司,兔抗 NF- κ B p65 多克隆抗体购自 Abcam 公司,碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG、碱性磷酸酶标记显色试剂盒购自碧云天生物科技公司,Trizol 试剂、逆转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,氯胺酮购自福建古田药业公司,批号 101103。

1.2 HUVECs 体外培养

HUVECs 株接种于无菌培养瓶中,加入适量含 1%青链霉素、10%胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37℃、5%CO₂、95%空气饱和湿度的培养箱中培养。每 2~3 d 换液 1 次,待细胞生长至培养瓶的 80%左右,用 0.25%胰蛋白酶消化,轻柔吹打成单细胞悬液,按 1:4 的比例接种传代。相差显微镜下细胞呈单层鹅卵石样排列时用于实验。

1.3 实验分组和方法

体外培养的 HUVECs 随机分为 4 组($n=6$):L 组(LPS 浓度为 1 μ g/ml)、C 组(空白对照组仅加入等体积的 DMEM 培养液)、KL1 组(氯胺酮浓度为 3 μ g/ml,LPS 浓度为 1 μ g/ml)、KL2 组(氯胺酮浓度为 30 μ g/ml,LPS 浓度为 1 μ g/ml)。预先分别在 KL1 组、KL2 组中加入氯胺酮至终浓度分别为 3、30 μ g/ml,于 37℃、5% CO₂ 孵育箱中孵育 30 min;除 C 组外,其余各组加入 LPS 至浓度为 1 μ g/ml,于 37℃、5% CO₂ 孵育箱中继续孵育 2 h。

1.4 Western blot 测定 NF- κ B 的活性

各组内皮细胞经 1.3 处理后终止培养后裂解,并收集细胞裂解液至离心管内离心备检。进行蛋白质的凝胶电泳,将蛋白从凝胶转移至硝酸纤维素膜。再经封闭,一抗、二抗反应,染色后用凝胶成像仪拍片、HPIAS 2000 图像分析系统分析膜上蛋白条带灰度值。

1.5 RT-PCR 测定 NF- κ B 的表达

各组内皮细胞经 1.3 处理后,按照 Trizol 试剂说明提取总 RNA,逆转录和扩增均按说明书操作。引物设计见表 1。反应参数:95℃预变性 4 min,95℃变性 30 s,54.8℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 个循环后 72℃延伸 10 min,4℃保存。1.5%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像仪拍片,并对各目的基因条带扫描,以 β -actin 为内参,分析各基因表达水平。

表 1 引物序列

Tab.1 Sequence of primer

基因	引物序列	目的大小	退火温度
β -actin	上游:5'-CTG GGA CGA	564 bp	59.4℃
	CATGGA GAA AA-3'		
	下游:5'-AAG GAA GGC		
	TGGAAG AGT GC-3'		
NF- κ B	上游:5'-TCG TTT CCG	227 bp	54.8℃
	TTATGT ATG T-3'		
	下游:5'-CCT TGG GTC		
	CAGCAG TTA-3'		

1.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

4 组 HUVECs NF- κ B 活性表达的免疫印迹结果见图 1, RT-PCR 结果见图 2。

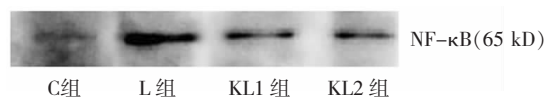


图 1 免疫印迹结果

Fig.1 Results of Western blot



图 2 RT-PCR 的结果

Fig.2 Results of RT-PCR

NF- κ B 易位活化的比较。在 2 组实验中,与 C 组比较,L 组、KL1 组、KL2 组 NF- κ B p65 表达增加($P=0.000$);与 L 组比较,KL1、KL2 组 NF- κ B p65 表达降低($P=0.000$);与 KL1 组比较,KL2 组 NF- κ B p65 表达降低($P=0.000$),见表 2。

表 2 各组内皮细胞核 NF- κ B 蛋白吸光度值的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison on the absorbance value of NF- κ B in

HUVECs ($\bar{x} \pm s$)

组别	NF- κ B mRNA	NF- κ B 蛋白
C组	0.37 $\pm$ 0.09	13.2 $\pm$ 1.7
L组	4.47 $\pm$ 0.21*	62.9 $\pm$ 1.6*
KL1组	2.67 $\pm$ 0.25 Δ	52.2 $\pm$ 2.3 Δ
KL2组	1.62 $\pm$ 0.45 Δ #	40.1 $\pm$ 2.1 Δ #

注:NF- κ B mRNA 实验组表达的方差值为 233.7;NF- κ B 蛋白实验组表达的方差值为 748.5;*,与 C 组比较, $P=0.000$; Δ ,与 L 组比较, $P=0.000$;#,与 KL1 组比较, $P=0.000$ ($n=6$)

3 讨论

Sen 等^[8]在 1986 年率先发现 NF- κ B 是一种能与免疫球蛋白轻链基因增强子 κ B 系列(GC-GACTTTC)特异性结合的核蛋白因子。在静止状态下,NF- κ B 与 I- κ B 抑制性蛋白结合处于未活化状态。当细胞受到炎症细胞因子、LPS 等刺激时,I- κ B 活化并解离,导致 NF- κ B 发生核易位活化,而活

化的 NF- κ B 又可诱导 IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- α 等多种炎症因子的表达,参与炎症反应、肿瘤及动脉粥样硬化等多种疾病的病理过程^[1-4]。而许多炎症介质蛋白质基因的启动子和增强子部位均存在 κ B 系列^[9]。因此若能有效地抑制 NF- κ B 的活性,可能有助于阻断上述疾病的病程演变,从而提供新的治疗平台。

临床上经静脉注射 2 mg/kg 氯胺酮时,其血药浓度可达 100 μ mol/L,麻醉维持时血药浓度常为 3 μ g/ml^[10],而氯胺酮的治疗系数是 8.5^[11],因此本实验在模拟炎症反应时,NF- κ B 活性增高而引发的“瀑布效应”时所用氯胺酮 3、30 μ g/ml 的浓度是安全的。在实验中观察发现,浓度为 3 μ g/ml 的氯胺酮可明显抑制 HUVECs 中 NF- κ B 的表达,且 NF- κ B 表达的抑制程度与氯胺酮的浓度呈正相关。因此我们认为,氯胺酮能在转录水平抑制炎症反应,其抑制 NF- κ B 的易位活化机制可能是其抗炎机制的重要组成部分。但有研究表明,在离体实验中大于临床麻醉血药浓度的氯胺酮通过降低细胞内 Ca^{2+} 的升高来抑制 NF- κ B 的活性表达,进而抑制其他炎症介质的释放^[12]。也有临床研究发现,在体外循环转机 30 min 后,氯胺酮组的 TNF- α 表达较对照组减弱,而 NF- κ B 的活性却没有差异,这可能与氯胺酮在早期直接抑制炎症介质有关^[13,14]。离体实验与临床实验存在差异,具体作用机制还不明确,有待以后进一步研究确认。

参 考 文 献

- [1] Martucci C, Franchi S, Lattuada D, et al. Differential involvement of RelB in morphine-induced modulation of chemotaxis, NO and cytokine production in murine macrophages and lymphocytes[J]. J Leukoc Biol, 2007, 81(1):344-354.
- [2] Wang J, Barke R A, Charboneau R, et al. Morphine impairs host innate immune response and increase susceptibility to streptococcus pneumoniae lung infection[J]. J Immunol, 2005, 174(1):426-434.
- [3] Ricciardi R, Kim R D, McDade T P, et al. NF kappaB expression during cold ischemia correlates with postreperfusion graft function[J]. J Surg Res, 2000, 93(1):35-40.
- [4] McCluskie M J, Krieg A M. Enhancement of infectious disease vaccines through TLR9-dependent recognition of CpG DNA[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2006, 311:155-178.
- [5] 陈根殷, 王旭光, 陈淑琼. 氯胺酮对大鼠肺缺血再灌注损伤的影响[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2006, 27(4s):53-55.
- Chen G Y, Wang X G, Chen S Q. The influence of detamine on rats lung ischemia-reperfusion injury[J]. Journal of Sun Yat-sen University (Medical Sciences), 2006, 27(4s):53-55.
- [6] 罗富荣. 氯胺酮与炎症反应[J]. 国外医学·麻醉学与复苏分册, 2003, 24(4):217.
- Luo F R. Ketamine and inflammation[J]. Foreign Medicine. Anesthesiology and Resuscitation, 2003, 24(4):217.
- [7] Yu Y, Zhou Z, Xu J, et al. Ketamine reduces NF- κ B activation and TNF- α production in rat mononuclear cells induced by lipopolysaccharide in vitro[J]. Ann Clin Lab Sci, 2002, 32(3):292-298.
- [8] Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences[J]. Cell, 1986, 46(5):705-716.
- [9] Su J R, Zhao Z C, Chen W L, et al. The effect of activated nuclear factor-kappa B in pathogenesis of acute pancreatitis[J]. Nail Med J China, 2003, 83(17):1497-1500.
- [10] Wieber J, Gugler R, Hengstmann H J, et al. Pharmacokinetics of ketamine in man[J]. Anaesthesist, 1975, 24(6):260-263.
- [11] 庄心良, 曾因明, 陈伯玺. 现代麻醉学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003:481-487.
- Zhuang X L, Zeng Y M, Chen B L. Modern anesthesiology[M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003:481-487.
- [12] Sun J, Zhou Z Q, Lv R, et al. Ketamine inhibits LPS-induced calcium elevation and NF-kappa B activation in monocytes[J]. Inflamm Res, 2004, 53(7):304-308.
- [13] 陈 翀, 陈 刚. 氯胺酮在体外循环中对核因子- κ B 及其他炎性介质表达的影响[J]. 社区医学杂志, 2010, 8(7):8-9.
- Chen C, Chen G. Effect of ketamine on nuclear factor-kappa B and other inflammatory medium in extracorporeal circulation[J]. Journal of Community Medicine, 2010, 8(7):8-9.
- [14] 罗富荣, 钟广玲, 陈志维, 等. 氯胺酮对家兔内毒素性急性肺损伤的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2006, 22(3):211-213.
- Luo F R, Zhong G L, Chen Z W, et al. Effects of ketamine on LPS-induced acute lung injury in rabbits[J]. Clin Anesthesiol, 2006, 22(3):211-213.

(责任编辑: 冉明会)