

谷氨酰胺对 COPD 外周血 NF- κ B 及 HSP70 表达的影响

黄美健¹, 汤晓燕¹, 周凌燕², 居建刚³, 冷报浪¹ (1.杭州市第三人民医院呼吸科, 杭州 310009; 2.湖州中心医院呼吸科, 浙江 湖州 313000; 3.安徽医科大学杭州临床学院, 杭州 310009)

摘要: 目的 探讨谷氨酰胺(Gln)对慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者外周血单个核细胞(PBMC)中核因子- κ B(NF- κ B)和热休克蛋白 70(HSP70)表达的影响。方法 选择 30 例 COPD 急性加重期(AECOPD)患者为研究对象, 设为 AECOPD 组, 将治疗 10~20 d 后处于稳定期的上述患者设为 SCOPD 组, 分别以 Gln 干预, 收集干预前后各组外周血 PBMC, 并以健康人为正常对照组。采用 Real-time PCR 法检测各组 PBMC 中 NF- κ B P65 mRNA 和 HSP70 mRNA 的表达水平。结果 AECOPD 和 SCOPD 组 NF- κ B P65、HSP70 的表达高于正常对照组($P < 0.05$), 且急性期增高更为显著; AECOPD 组和 SCOPD 组中, 用 Gln 干预的较未用 Gln 的 PBMC 中 HSP70 表达升高($P < 0.05$), 而 NF- κ B P65 表达下降($P < 0.01$)。结论 Gln 可抑制 COPD 患者炎症因子 NF- κ B 的活性, 升高 HSP70 的表达。

关键词: 慢性阻塞性肺疾病; 谷氨酰胺; 核因子- κ B; 热休克蛋白 70

中图分类号: R969.4

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)01-0122-04

Effects of Glutamine on Expression of Nuclear Factor- κ B and Heat Shock Protein 70 in PBMC of Patients with COPD

HUANG Meijian¹, TANG Xiaoyan¹, ZHOU Linyan², JU Jianguang³, LENG Baolang¹ (1. *Pneumology Department of the Third People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310009, China*; 2. *Huzhou Central Hospital, Huzhou 313000, China*; 3. *Hangzhou Clinical Institute of Anhui Medical University, Hangzhou 310009, Hangzhou*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To discuss the effects of glutamine on the nuclear factor factor- κ B(NF- κ B) and heat shock protein 70(HSP70) in peripheral blood mononuclear cells(PBMC) of patients with chronic obstructive pulmonary disease(COPD). **METHODS** Thirty patients with acute exacerbation of COPD(AECOPD) were improved to stable stage(SCOPD), and then divided into two groups: blank control group and Gln group. Fifteen healthy people were in the normal group. The levels of NF- κ B and HSP70 gene expression were detected by real-time PCR. **RESULTS** The levels of gene expression of NF- κ B and HSP70 in blank control of AECOPD and SCOPD were higher than those in the normal group($P < 0.05$). After glutamine treatment, the expression of HSP70 increased in both AECOPD and SCOPD($P < 0.05$), while NF- κ B P65 decreased($P < 0.01$). **CONCLUSION** Glutamine can inhibit expression of NF- κ B and increase HSP70.

KEY WORDS: chronic obstructive pulmonary disease; glutamine; nuclear factor- κ B; heat shock protein 70

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是呼吸系统的常见慢性疾病之一, 由于其患病人数多, 死亡率高, 社会经济负担重, 已成为一个重要的公共卫生问题。COPD 发病机制尚未十分明了, 至今仍未找到可以阻止 COPD 患者肺功能逐步恶化的有效治疗方法^[1]。COPD 的病理基础是慢性气道异常炎症反应, 抑制炎细胞活性已成为治疗 COPD 的研究热点之一。谷氨酰胺(Gln)是人体中的一种条件性必需氨基酸, 对 COPD 合并营养不良患者免疫功能有显著改善作用。本研究通过检测 Gln 对 COPD 患者外周血单个核细胞中核因子- κ B P65(NF- κ B P65)和热休克蛋白 70(HSP70)表达的影响, 来探讨 Gln 在 COPD

治疗中的作用, 为临床治疗 COPD 提供新的手段。

1 材料和方法

1.1 试剂

人淋巴细胞分离液(天津灏阳生物公司); 无 Gln 的 RPMI1640 培养液(GIBCO); Trizol(上海生物工程有限公司); 氯仿(浙江迪耳药业有限公司, 批号: 051103); 异丙醇(杭州长征化学试剂有限公司, 批号: 20111110); DEPC[宝生物工程(大连)有限公司]; 反转录试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司); SYBR Premix Ex Taq 试剂盒 Marker [宝生物工程(大连)有限公司, 批号: DL2000]; 定量试剂盒(TAKARA)。

1.2 研究对象

基金项目: 杭州市卫生局(2011B009)

作者简介: 黄美健, 女, 硕士, 主任医师 Tel: (0571)87827257

E-mail: hmeijian@21cn.com

自 2011 年 5 月—2012 年 4 月在我院呼吸内科住院患者中选择符合中华医学会呼吸病分会制定的 COPD 急性加重期(AECOPD)(诊断标准为: FEV1/FVC<70.0%且近期出现咳嗽、咳痰和气短加重,痰量增多呈脓性)诊断标准的患者设为 AECOPD 组,共 30 例,其中男性 18 例,女性 12 例,年龄 54~75 岁,平均年龄(70.1±4.7)岁,并排除心脑血管系统的所有疾病、呼吸系统的其他疾病、较严重的消化系统疾病、肾病、糖尿病等内分泌代谢疾病、肿瘤以及重大手术和结缔组织病等;均未高流量吸氧(吸氧浓度≤35%)及未行机械通气;近 1 年内未用过糖皮质激素;不吸烟或已戒烟 5 年以上。上述患者经治疗 10~20 d 后,咳嗽、咳痰和气短明显减少,痰呈白色,肺功能较前好转的患者,设为 COPD 稳定期组(SCOPD),门诊健康体检者 15 例作为正常对照组,其中男性 9 例,女性 6 例,年龄 52~76 岁,平均年龄(68.4±6.9)岁,且近 1 个月内未患过任何疾病且不吸烟或已戒烟 5 年以上。AECOPD 组和正常对照组年龄差异无统计学意义。

1.3 实验方法

1.3.1 单个核细胞的提取 研究对象清晨采取肘静脉血 5 mL 注入肝素抗凝管内,加入等体积的 PBS 液。室温下,将 4 mL 人淋巴细胞分离液加入 15 mL 离心管,再将 10 mL 人血稀释液轻轻沿管壁加至分离液上,保持两者界面清晰。室温下以 1 500 r·min⁻¹ 离心 15 min,管内分为 4 层,从上向下依次是稀释的血浆、单个核细胞、分离液、粒细胞和红细胞,毛细吸管吸取灰白的单个核细胞(PBMC),再以 5 倍体积的 PBS 液混匀,1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃去上清液,即得到 PBMC。

1.3.2 分组 提取出的 PBMC 用无 Gln 的 RPMI1640 培养液调节细胞浓度为 2.0×10⁶ 个·mL⁻¹。正常对照组的 PBMC 只用 Gln1640 培养液培养;AECOPD 患者的 PBMC 平均分成 2 组:①空白对照组:仅用 1640 培养液培养;②Gln 组:Gln 终浓度为 8 mmol·L⁻¹。SCOPD 患者的 PBMC 平均分成 2 组:①空白对照组:仅用 1640 培养液培养;②Gln 组:Gln 终浓度为 8 mmol·L⁻¹。-80 °C 冻存细胞。

1.3.3 引物设计 采用 Primer 5.0 引物设计软件和引物设计原则进行荧光引物的设计,然后由上

海生物工程有限公司负责合成:

NF-κB P65 引物序列:上游 5'-GCGAGAGGA GCACAGATACC-3',下游 5'-CTGATAGCCTGCT CCAGGTC-3'; HSP79 引物序列:上游 5'-CAGCA GACACCAGCAGAAAA-3',下游 5'-TCCGCTCC TTCTCCAGTTTA-3';内参 GAPDH 引物序列:上游 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTCC-3'。扩增长度分别为 250, 238 和 226 bp。

1.3.4 Trizol 法提取 RNA

1.3.5 cDNA 合成 用反转录酶合成 cDNA,按试剂盒操作。

1.3.6 PCR 反应 反应条件:94 °C 5 min,94 °C 15 s,60 °C 45 s,循环扩增 40 次。60 °C 检测荧光值。

1.3.7 表达分析 在 ABI7500 软件体系中调整基线和阈值,读出各反应孔 Ct 值。各个基因的相对表达水平以相对表达量 ΔCt 或(2^{-ΔCt}×10⁴) 进行分析,ΔCt 值越高,表达越低。

1.3.8 统计学分析 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析用 *t* 检验,*P*<0.05 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 目的基因及内参电泳图

电泳条带和设计的扩增条带长度全部符合,且电泳图中无杂质条带,说明 PCR 为特异性扩增。结果见图 1。



图 1 目的基因和内参电泳图

1-NF-κB P65; 2-HSP70; 3-APDH; M-marker

Fig 1 Electrophoretic bands of NF-κB P65 and HSP70

1-NF-κB P65; 2-HSP70; 3-GAPDH; M-marker

2.2 Real-time PCR法检测各组PBMC中NF- κ B P65 mRNA 和 HSP70 mRNA 的表达水平

AECOPD(30例)和SCOPD组(30例)NF- κ B P65、HSP70的表达高于正常对照组(15例)($P<0.05$),且急性期增高更为明显(采用独立样本T检验),结果见表1。

表1 空白对照组和正常对照组NF- κ B P65、HSP70的 Δ Ct值比较

组别	NF- κ B P65	HSP70
正常对照组	10.79 \pm 0.78	11.59 \pm 1.00
SCOPD 空白组	9.80 \pm 0.52 ¹⁾	8.93 \pm 1.49 ²⁾
AECOPD 空白组	9.16 \pm 0.45 ¹⁾	8.71 \pm 1.55 ²⁾

注: ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$
Note: ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

AECOPD组(30例)和SCOPD组(30例)中,用Gln干预的较未用Gln的PBMC中HSP70表达均升高($P<0.05$),而NF- κ B P65表达均下降($P<0.01$),结果见表2。

表2 Gln处理前后NF- κ B P65、HSP70的 Δ Ct值比较

Tab 2 Comparison of NF- κ B P65 and HSP70 before and after treatment

处理 前后	NF- κ B P65		HSP-70	
	AECOPD	SCOPD	AECOPD	SCOPD
处理前	9.16 \pm 0.45	9.80 \pm 0.52	8.71 \pm 1.55	8.93 \pm 1.49
处理后	10.04 \pm 0.75 ²⁾	10.36 \pm 0.53 ²⁾	8.22 \pm 1.52 ¹⁾	8.58 \pm 1.46 ¹⁾

注: ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$
Note: ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

3 讨论

COPD是一种具有气流受限特征的可以预防和治疗的疾病,与肺脏对吸入烟草烟雾等有害气体或颗粒的异常炎症反应有关^[2]。目前普遍认为COPD患者肺的不同部位有肺泡巨噬细胞、T淋巴细胞和中性粒细胞增加,激活的炎症细胞释放多种介质和细胞因子,从而破坏肺的结构和促进中性粒细胞炎症反应,导致COPD的发生发展。多方面寻求治疗COPD的方法势在必行。

NF- κ B是一类具有促基因转录功能的蛋白质^[3],其介导多种细胞因子的转录活化过程。在非激活状态下,NF- κ B常以p65/p50的异源二聚体的形式存在于胞浆中,起主要的生物功能,最常用于检测。Mario等^[4]研究表明TNF- α 可增加单个

核细胞NF- κ B的表达,且可以通过下调NF- κ B的活性而降低炎症因子的合成。可见,炎症因子和NF- κ B相互作用,构成炎症的“网络”系统,促使炎症持续不断地发展。Andrew等^[5]发现吸烟可导致金属基质蛋白-12(MMP-12)野生型小鼠肺组织NF- κ B活化及TNF- α 、巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP-2)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)基因表达增加,以及肺组织E-选择素水平升高,提示吸烟导致的肺组织损伤是通过活化NF- κ B而促进炎症因子的合成增加导致炎症反应。以上研究均说明NF- κ B与慢性气道炎症的发生发展有着极为密切的关系。

HSP是一种高效表达且在进化上高度保守的蛋白质,可以提高细胞的应激能力。而HSP70是其中最为保守、最为重要的一种,在人气道上皮细胞和平滑肌细胞中存在表达,在应激的情况下可出现高表达,可保护气道细胞抵抗对有害刺激(如吸烟、感染)的损害^[6]。秦雪冰等^[7]发现HSP70可通过减少细胞因子的产生,保护肺组织避免呼吸机所致肺损伤。另外有研究发现HSP70与NF- κ B之间也存在相互竞争与拮抗的关系,HSP70可能竞争进入核孔转运的NF- κ B复合体,抑制NF- κ B活化,阻断炎症因子过量产生,从而减轻炎症反应^[8-9]。

近年来有研究显示,Gln能增加大鼠组织HSP70和HSP25的表达而起到抗炎作用^[10],它能下调脂多糖(LPS)刺激下人体PBMC中多种炎症因子的过度表达^[11]。耿桂启等^[12]发现,Gln预处理可以抑制大鼠肠缺血/再灌注后肺组织NF- κ B表达,减少炎症介质的产生,其部分机制是通过诱导HSP表达进而抑制NF- κ B的活化而实现的。

基于上述文献报道,NF- κ B、HSP70与COPD的发病可能有一定的相关性,且谷氨酰胺有一定的抗炎作用,本实验以此为靶点,应用Gln干预COPD患者PBMC,观察细胞中NF- κ B P65和HSP70表达水平的变化。PCR扩增电泳图显示NF- κ B P65、HSP70在单个核细胞中存在表达,提示在炎症中均有NF- κ B P65、HSP70参与。结果显示,正常对照组NF- κ B P65、HSP70的表达低于AECOPD和SCOPD空白对照组,且急性期增高更为明显,表明NF- κ B和HSP70与慢性气道炎症的发生发展有着极为密切的关系,且呈正相关。AECOPD组和SCOPD组中,用Gln干预的较未用

Gln 的 PBMC 中 HSP70 表达均升高,而 NF- κ B P65 表达均下降,有统计学意义,NF- κ B P65 下降得更为显著,表明无论在急性期还是稳定期,Gln 能上调 HSP70 的表达而抑制 NF- κ B 的表达,对 NF- κ B 的作用更为明显。目前国内关于 Gln 对 COPD 患者 PBMC 中 NF- κ B mRNA 及 HSP-70 mRNA 表达的影响还尚未见报道。本研究首次采用 COPD 患者外周血 PBMC 为研究对象,应用 Gln 干预 COPD 患者 PBMC,观察细胞中 NF- κ B 和 HSP70 表达水平的变化,明确了二者参与了 COPD 的炎症反应,为药物治疗 COPD 提供新的理论依据。但目前的研究仅限于细胞水平,还需要进一步体内研究证实。

REFERENCES

- [1] LIU T, PENG M, CAI B Q. Role of glucocorticoid receptor of nuclear factor κ B in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Acta Acad Med Sci(中国医学科学院学报), 2010, 32(2): 147-150.
- [2] VESTBO J, HURD S S, ROISIN R R. The 2011 revision of the global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD (GOLD) – why and what? [J]. Clin Respir J, 2012, 6(4): 208-214.
- [3] LINDSTROM T M, BENNETT P R. The role of nuclear factor kappa B in human labour [J]. Reproduction, 2005, 130(5): 569-581.
- [4] PACCANI S R, TONELLO F, GHITTONI R. Anthrax toxins

- suppress T lymphocyte activation by disrupting antigen receptor signaling [J]. J Exp Med, 2005, 201(3): 325-331.
- [5] ANDROW C, WANG RD, HSIN T. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor release [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(8): 1083-1089.
- [6] SHEHATA S M, SHARMA H S, MOOI W J. Expression patterns of heat shock proteins in lungs of neonates with congenital diaphragmatic hernia [J]. Arch Surg, 1999, 134(11): 1248-1253.
- [7] QIN X B, YU S Y. Heat shock protein 70 expression and relation with cytokines in ventilator-induced lung injury in rabbit [J]. China J Mod Med(中国现代医学杂志), 2007, 17(1): 44-50.
- [8] ZHENG Z, KIM J Y, MA H. Anti-inflammatory effects of the 70 kDa heat shock protein in experimental stroke [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(1): 53-63.
- [9] SCHELLI M T, SPITZER A L, JOHSON J A. Heat shock inhibits NF- κ B activation in a dose- and time-dependent manner [J]. Surg Res, 2005, 129(1): 90-93.
- [10] SINGLETON K D, SERKOVA N, BECKEY V E, et al. Glutamine attenuates lung injury and improves survival after sepsis: role of enhanced heat shock protein expression [J]. Crit Care Med, 2005, 33(6): 1206-1213.
- [11] WANG L M, WANG X Y, PAN L Y. Inhibitor of glutamine in cytokines overexpression in mononuclear cell [J]. Parenter Enter Nutr(肠外与肠内营养), 2010, 17(1): 29-31.
- [12] GENG G Q, HUANG S Q. The effect of glutamine on NF- κ B expression in rat lungs after intestinal ischemia/reperfusion [J]. Fudan Univ J Med Sci(复旦学报:医学版), 2009, 36(5): 566-573.

收稿日期: 2012-07-16

不同浓度瑞芬太尼预处理对人肝细胞缺氧复氧损伤保护作用的影响

陈文华¹, 李丽珍², 林鹏焘¹, 郑昊¹, 阮姗², 涂芸芸²(1.福建医科大学附属协和医院,福州 350001; 2.福建医科大学协和临床医学院,福州 350001)

摘要: 目的 研究不同浓度瑞芬太尼预处理对人肝细胞缺氧复氧损伤保护作用的影响,探讨瑞芬太尼预处理的适宜浓度。方法 将培养的人肝细胞按瑞芬太尼的浓度梯度分为 11 组:正常对照组(N 组),缺氧复氧组(IR 组),瑞芬太尼预处理组(RE1~RE8 组):瑞芬太尼终浓度分别为 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ng·mL⁻¹ 预处理 1 h 后建立缺氧复氧模型,生理盐水组(NS 组)。N 组正常条件下培养,其他组缺氧 8 h,复氧 4 h。复氧结束即刻,MTT 法检测肝细胞活力;全自动生化仪检测细胞培养液中谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)和乳酸脱氢酶(LDH)水平;MDA 试剂盒检测肝细胞内丙二醛(MDA)含量。结果 与 N 组比较,其他各组细胞活力降低,AST, LDH 水平和细胞内 MDA 含量升高($P < 0.05$)。与 IR 组和 NS 组比较,RE2~RE6 组细胞活力升高,AST、LDH 水平和细胞内 MDA 含量降低($P < 0.05$);而 RE1、RE7 和 RE8 组各项指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 临床有效血药浓度(1~30 ng·mL⁻¹)瑞芬太尼预处理对肝细胞缺氧复氧损伤具有保护作用,而低浓度(0.5 ng·mL⁻¹)和高浓度(≥ 40 ng·mL⁻¹)瑞芬太尼预处理则无此作用。

关键词: 瑞芬太尼; 麻醉药物预处理; 人肝细胞; 缺氧复氧损伤

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)01-0125-06

作者简介: 陈文华,男,主任医师,副教授,硕导

Tel: 13625081007

E-mail: whc6202@163.com