

· 论 著 ·

NF- κ B 活化在四氢吡咯二硫代氨基甲酯对抗全氟异丁烯吸入性肺损伤中的预防作用

赵 建, 丁高, 阮金秀, 王和枚, 张宪成, 孙晓红, 黄春倩

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 目的 研究四氢吡咯二硫代氨基甲酯 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) 对抗小鼠全氟异丁烯 (perfluoroisobutylene, PFIB) 吸入性急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 的预防作用机制。方法 采用小鼠动态吸入 PFIB 周身暴露染毒装置对实验小鼠进行染毒, 应用电泳泳动分析法 (electrophoretic mobility shift assays, EMSA) 检测肺组织核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的表达情况; 采用 RIA 检测血清中 IL- β 、IL-8 的含量变化。结果 PFIB 吸入染毒后, 肺组织内 NF- κ B 的表达明显高于正常组, 染毒前 30 min PDTC (120 mg/kg) 预防可以显著抑制 NF- κ B 的表达; 小鼠血清中 IL- β 、IL-8 的含量在 PFIB 染毒后显著升高, 染毒前 30 min PDTC (120 mg/kg) 预防可以显著地抑制这种升高。结论 PDTC 对小鼠 PFIB 吸入性肺损伤具有预防作用可能是基于其对 NF- κ B 的抑制, 进而抑制前炎症细胞因子 IL- β 、IL-8 等的过度表达, 从而抑制了过度炎症的进一步发展。

关键词: 全氟异丁烯; 四氢吡咯二硫代氨基甲酯; 急性肺损伤; NF- κ B; IL- β ; IL-8

中图分类号: R563 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2004)03-0145-04

The role of NF- κ B activation in the protective mechanism of pyrrolidine dithiocarbamate against acute lung injury induced by PFIB inhalation in mice

ZHAO Jian, DING Ri-gao, RUAN Jin-xiu, WANG He-mei, ZHANG Xian-cheng, SUN Xiao-hong, HUANG Chun-qian

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract: **Objective** To elucidate a NF- κ B activation role in the preventive effect of PDTC against PFIB inhalation induced ALI. To study the intrinsic mechanism of the protective effect of pyrrolidine dithiocarbamate against acute lung injury induced by PFIB inhalation in mice. **Method** Kunming mice were exposed to gaseous PFIB [(130 $\pm$ 5) mg/m³] for 5 minutes in a flow exposure system. The levels of NF- κ B in lung tissue were assayed by EMSA, the levels of IL- β and IL-8 in serum were measured by RIA. **Result** Increased activity of NF- κ B was observed at 0.5 h after PFIB exposure, overexpression of IL- β and IL-8, two well known proinflammatory cytokines was observed at 0.5 h and 1 h after PFIB inhalation. PDTC (120 mg/kg) pretreatment could significantly inhibit the activation of NF- κ B and the overexpression of cytokines which well related to the preventive effects of PDTC such as decreased mortality, reduced lung coefficient etc. **Conclusion** The preventative effect of PDTC against the lung injury by PFIB inhalation was identified, the mechanism of action may be its inhibitory effect on the activation of NF- κ B.

Key words: Perfluoroisobutylene; Pyrrolidine dithiocarbamate; Acute lung injury; NF- κ B; IL- β ; IL-8

全氟异丁烯 (perfluoroisobutylene, PFIB) 是氟聚合物工业生产过程中常见的副产物, 其泄漏多见于氟塑料工业生产意外以及废液处理过程中; 另外, 随着氟聚合物产品的广泛应用, 在火灾事故中, 亦多伴有 PFIB 的生成。据文献报道, 其毒性比光气毒性强约 10 倍, 具有强大的肺杀伤性作用, 其吸入可产生急性肺损伤、肺水肿, 甚至导致死亡, 早期称为“聚合物烟雾热 (polymer fume fever)”^[1-3]。至目前为止尚没有特效解救药物和防治措施。因此, PFIB 对氟塑料

工业从业人员和公众而言是一种潜在的威胁, 有必要对其进行深入的研究, 以阐明其毒性作用机制, 研究其有效的解救药物和防治措施。

Lehnert 等的实验发现和我们的研究表明, PFIB 吸入性急性肺损伤的关键环节是中性粒细胞的肺内集聚和扣押^[4,5]。在内毒素、缺血再灌注肺损伤中, 核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的激活在上述关键环节的过程中发挥着重要的作用, 其激活可以启动或促进炎性细胞因子 (IL- β 、IL-8, TNF- α 等) 的过度表达, 进而趋化和激活中性粒细胞向肺组织的积聚和扣押, 并延长其寿命, 使得多形核粒细胞 (polymorphonuclear leukocyte, PMN) 被持续激活, 释

收稿日期: 2004-01-15; 修回日期: 2004-02-23

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (编号: 30300280)

作者简介: 赵建 (1975-), 男, 山东肥城人, 博士研究生, 研究方向: 化学源性肺损伤。

放过多的蛋白酶和 ROS, 造成局部组织过度炎症反应^[6-8]。以往的实验表明^[9], 四氢吡咯二硫代氨基甲酯 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) 预防性给药可以显著地提高 PFIB 中毒小鼠的存活率, 降低 PFIB 染毒小鼠各项肺系数以及支气管肺灌液中的蛋白渗出, 提示 PDTC 对 PFIB 中毒小鼠具有预防性保护作用; 而在 PFIB 染毒后给予 PDTC 则未观察到明显的治疗作用。调研文献发现 PDTC 具有 NF- κ B 抑制剂和抗氧化剂的作用, 有很好的抗炎效果^[10-11]。为了阐明 NF- κ B 活化与 PDTC 对抗 PFIB 吸入性急性肺损伤预防作用的关系, 我们以 PFIB 吸入性小鼠急性肺损伤为模型, 观察 PFIB 以及 PDTC 作用前后小鼠肺组织中 NF- κ B 和血清中 IL-1 β , IL-8 等的含量变化, 基此试以阐明 PDTC 对 PFIB 吸入性肺损伤的预防作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

PFIB (纯度 98%, 上海有机氟材料研究所提供), PDTC (纯度 99%, 购自 Sigma 公司), NF- κ B 探针 (由北京赛百胜公司合成); 5'-TTTTCGA GCT CGG-GAC TTT CCG AGC 3' 和 3'-GCT CGA GCC CTG AAA-GGC TCGTTT 5', [α -³²P] dATP (由北京市福瑞生物工程公司³²P 研究室提供), IL-1 β 、IL-8 RIA KIT (购自解放军总医院放射免疫研究所), SQ-204 气相色谱仪 (购自北京分析仪器厂), UV-160A 型紫外-可见光分光光度计 (购自岛津公司)。

1.2 实验动物

昆明种小鼠, 18~22 g, 雌雄各半, 购自军事医学科学院实验动物中心。动物实验前先适应性喂养 2~3 d, 自由饮食饮水。

1.3 染毒方法

小鼠动态吸入 PFIB 周身暴露染毒装置及 PFIB 染毒浓度的测定方法参照文献^[12]。PFIB 吸入性小鼠急性肺损伤模型的制备条件为: (130 $\pm$ 5) mg/m³, 5 min, 单次染毒。

1.4 检测指标

1.4.1 PDTC 对 PFIB 吸入中毒小鼠肺组织中 NF- κ B 含量的影响 实验动物随机分为对照组、PDTC 组、PFIB 组以及 PDTC+PFIB 组。PFIB 组和 PDTC+PFIB 组分别在染毒后 0.5 h、1 h、2 h、4 h 经股动脉放血处死, 取肺置于液氮中保存备用。在 PFIB 染毒前 30 min, 予 PDTC 120 mg/kg, 单次腹腔注射。

小鼠肺组织 NF- κ B 含量的测定采用电泳泳动分析

(electrophoretic mobility shift assays, EMSA)^[13-15] 方法。电泳结束后进行放射自显影, 并应用 Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software 进行半定量分析。

1.4.2 PDTC 对 PFIB 吸入中毒小鼠血清中 IL-1 β 、IL-8 的含量的影响 实验动物随机分组同上。PFIB 组和 PDTC+PFIB 组分别在染毒后 0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h 和 16 h, i.p. 苯巴比妥钠 (50 μ g/g) 麻醉小鼠, 采用摘眼球取血, 37 $^{\circ}$ C 孵浴 30 min 后, 3 000 r/min 离心 20 min, 吸取上层血清分装成 100 μ l, -20 $^{\circ}$ C 冰冻保存备用。在 PFIB 染毒前 30 min, PDTC 120 mg/kg 单次腹腔注射。

血清中 IL-1 β 和 IL-8 的含量测定参照 RIAKIT 说明书进行操作。

1.5 统计方法

使用统计软件 Statistica6.0 对实验数据进行方差分析 (组间两两比较使用 Turkey 法) 并进行作图, 其数据表示形式为 $\bar{x} \pm s$ 。

2 实验结果

2.1 PDTC 对 PFIB 吸入中毒小鼠肺组织中 NF- κ B 含量的影响

PFIB 染毒后 0.5 h, NF- κ B 的表达即出现显著升高, 1 h 的表达水平与 0.5 h 相当, 随后可以观察到 NF- κ B 的水平下降, 至 8 h 时降到正常水平。在染毒前 30 min 给予 PDTC 预防后, 明显地抑制了染毒后 0.5 h 的 NF- κ B 表达的升高 (见图 1, 图 2)。

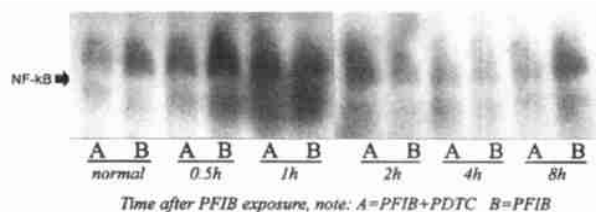


图 1 PDTC 与 PFIB 作用下不同时间点小鼠肺组织中 NF- κ B 的含量变化

2.2 PDTC 对 PFIB 吸入中毒小鼠血清中细胞因子含量的影响

2.2.1 对血清 IL-1 β 含量的影响 PFIB 染毒后 0.5 h 即可看到小鼠血清中 IL-1 β 显著升高, 与正常对照组比较, $P < 0.05$; PFIB 染毒组小鼠 1 h 血清中 IL-1 β 的含量达到最高水平, PFIB 组与正常对照组比较, $P < 0.01$ 。在给予 PDTC 预防以后, 可以显著抑制 PFIB 染毒所致的小鼠血清中 IL-1 β 的升高, 并将其维持在一个较低的水平。见图 3。

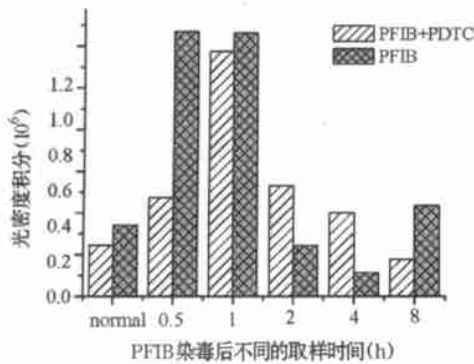
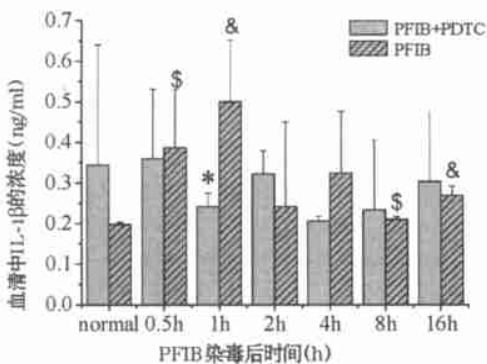


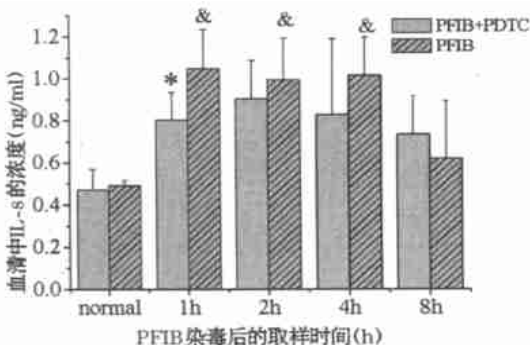
图2 PDTC与PFIB作用下小鼠肺组织中NF-κB的含量变化(光密度积分)



*与PFIB组比较 $P < 0.05$ &与正常对照组比较 $P < 0.01$,
\$与正常对照组比较 $P < 0.05$

图3 PDTC与PFIB作用下不同时间点小鼠血清中IL-1β含量的变化

2.2.2 对血清IL-8含量的影响 PFIB染毒后1h可以看到小鼠血清中IL-8的显著升高,并维持高水平表达至染毒后4h,图4可见,染毒后1h、2h和4h PFIB组与正常对照组比较, $P < 0.01$ 。在给予PDTC预防以后,可以显著抑制PFIB染毒所致的小鼠血清中IL-8的升高并将其维持在一个较低的水平,染毒后1h PDTC预防组与PFIB组比较, $P < 0.05$ 。



*与PFIB组比较 $P < 0.05$ &与正常对照组比较 $P < 0.01$

图4 PDTC与PFIB作用下小鼠血清中IL-8含量的变化

3 讨论

继以往四氢吡咯二硫代氨基甲酯对全氟异丁烯吸入性肺损伤的防治研究之后,我们又探讨了NF-κB活化与PDTC对抗全氟异丁烯吸入性急性肺损伤预防作用的关系。结果发现,在PFIB染毒后0.5h,NF-κB即被激活并维持至染毒后1h;炎性细胞因子IL-1β在染毒后0.5h即开始显著性升高至染毒后1h达峰,其后快速降低;IL-8则在染毒后1h达峰并维持高水平表达至染毒后4h,其后缓慢降低。PDTC预防可以明显抑制NF-κB的活化,进而抑制炎性细胞因子的过度表达并将其维持在一个较低的水平。

大量实验研究表明,NF-κB是Rel家族中的一员,由P50和P65亚单位组成。正常情况下,与NF-κB抑制剂α(inhibitor of NF-κBα, IκBα)结合以聚合体的形式游离于细胞浆中;在多种刺激因子(如LPS、TNF-α、ROS)的作用下,通过IκBα磷酸化降解,导致NF-κB-IκBα聚合体解聚,释放出活化的NF-κB,其进一步迁移入核,结合到核内基因的κB识别位点(大多位于促炎细胞因子基因的启动子和增强子区域),与其他转录因子共同作用起始或增强促炎细胞因子(IL-1β, IL-8等)的转录表达^[6,15]。我们的实验结果表明PFIB吸入性急性肺损伤亦存在类似的发病机制,即PFIB通过活化NF-κB入核来引发促炎细胞因子的过度表达,在这些过度表达的促炎细胞因子的作用下趋化中性粒细胞肺内积聚和扣押,并在局部激活这些炎症细胞产生并释放大量蛋白酶和ROS来形成局部组织的过度炎症反应。本实验通过对以往结果的进一步研究和解释,发现PFIB吸入性急性肺损伤并未能脱离炎症反应的一般规律。这也提示我们对于PFIB吸入性肺损伤的救治药物和防治措施的研究可以借鉴和应用过度炎症反应的研究成果。

PDTC是二硫代氨基甲酯(dithiocarbamate)的吡咯衍生物,可以通过阻止IκB的从头磷酸化和后续降解反应,抑制IκBα降解失活,阻止NF-κB活化转移入核,从而抑制NF-κB作用的发挥,对抗炎症的发生发展过程,降低细胞损伤程度^[10,11,16~19]。另有实验研究表明,PDTC可以诱导编码GCS两个亚单位基因的活化,增强从头合成细胞保护剂谷胱甘肽的能力,减轻脂质过氧化,降低丙二醛水平^[20,21],因而在一定程度上可能对吸入PFIB所致的氧化-还原系统失衡起到纠正作用。由此可以看出PDTC对PFIB吸入性肺损伤的预防作用可能基于NF-κB抑制及其抗氧化的效应。另一方面也为我们进行化学源性吸入性肺损伤

的防治药物研究提供一个思路,即以 NF- κ B 为药物靶标进行新的、更加有效的药物筛选和研究,预期可以发现防治急性肺损伤更好的药物。

参考文献:

- [1] 张宪成. 全氟异丁烯的理化性质及侦检防护 [J]. 国外医学军事医学分册, 1995, 12 (3): 113-118.
- [2] Robbins JJ, Ware RL. Pulmonary edema from teflon fumes [J]. New England Journal of Medicine, 1964, 271: 360-361.
- [3] Harris DK. Polymer-fume fever [J]. Lancet, 1951, 1008-1011.
- [4] Lehnert BE, Archuleta D, Behr MJ, et al. Lung injury after acute inhalation of perfluoroisobutylene: exposure concentration-response relationships [J]. Inhal Toxicol, 1993, 5: 1-32.
- [5] Wang HM, Ding RG, Ruan JX, et al. Perfluoroisobutylene-induced acute lung injury and mortality are heralded by neutrophil sequestration and accumulation [J]. J Occup Health, 2001, 43 (6): 331-338.
- [6] Shenkar R, Abraham E. Mechanisms of lung neutrophil activation after hemorrhage or endotoxemia: role of reactive oxygen intermediates, NF- κ B, and cyclic AMP response element binding protein [J]. J Immunol, 1999, 163: 954-962.
- [7] Jie F, Richard D, Asrar B. Transcriptional mechanisms of acute lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 281(5): L1037-1050.
- [8] John J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox (y)-sensitive transcription factor [J]. Cellular Signalling, 2002, 14: 879-897.
- [9] 赵建, 丁日高, 张宪成, 等. 四氢吡咯二硫代氨基甲酯对全氟异丁烯吸入性肺损伤的防治效果 [J]. 中国工业医学杂志, 2001, 14 (6): 331-335.
- [10] Pilar L, Sara MM, Monica M, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate protects mice from lethal shock induced by LPS or TNF- α [J]. Eur J Immuno, 1999, 29: 1890-1900.
- [11] Traenckner EB, Wilk S, Baeuerle PA. A proteasome inhibitor prevents activation of NF- κ B and stabilizes a newly phosphorylated form of I κ B- α that is still bound to NF- κ B [J]. EMBO J, 1994, 13 (22): 5433-5441.
- [12] 张宪成, 王文珠, 彭双清, 等. 不同吸附剂对 PFIB 防护性能的实验研究 [J]. 中国工业医学杂志, 1999, 12 (3): 136-138.
- [13] Negoro N, Kanayama Y, Haraguchi M, et al. Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells in vivo [J]. J Clin Invest, 1995, 95: 1140-1150.
- [14] Hernandez Presa M, Bustos C, Ortego M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis [J]. Circulation, 1997, 95 (6): 1532-1541.
- [15] Abraham E, Camody A, Shenkar R, et al. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage or endotoxemia-induced acute lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279: L1137-1145.
- [16] Kuo HP, Wang CH, Huang KS, et al. Nitric oxide modulates interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synthesis by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161 (1): 192-199.
- [17] Zhou J, Struthers AD, Lyles GA. Differential effects of some cell signalling inhibitors upon nitric oxide synthase expression and nuclear factor-kappa B activation induced by lipopolysaccharide in rat aortic smooth muscle cells [J]. Pharmacol Res, 1999, 39 (5): 363-373.
- [18] Walker G, Kunz D, Pignat W, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate differentially affects cytokine and cAMP-induced expression of group II phospholipase A2 in rat renal mesangial cells [J]. FEBS Lett, 1995, 364 (2): 218-222.
- [19] Liu SF, Ye X, Malik AB. Pyrrolidine dithiocarbamate prevents I- κ B degradation and reduces microvascular injury induced by lipopolysaccharide in multiple organs [J]. Mol Pharmacol, 1999, 55 (4): 658-667.
- [20] Nathans AB, Bitar R, Davreux C, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates endotoxin-induced acute lung injury [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17 (5): 608-616.
- [21] Wild AC, Mulcahy RT. Pyrrolidine dithiocarbamate up-regulates the expression of the genes encoding the catalytic and regulatory subunits of gamma-glutamylcysteine synthetase and increases intracellular glutathione levels [J]. Biochem J, 1999, 338 (Pt3): 659-665.

·短篇报道·

林可霉素致过敏性休克 1 例

宋德兰

(丹东市第二医院, 辽宁 丹东 118002)

林可霉素的主要不良反应有胃肠道反应, 偶有腹泻、粒细胞减少、转氨酶增高及皮疹等。现将 1 例静脉滴注林可霉素致过敏性休克的资料报道如下。

患者, 女, 31 岁, 因感冒扁桃体发炎及有青霉素过敏史, 而用林可霉素 1.2 g + 500 ml 等渗葡萄糖注射液静脉滴注。瞬间患者便感心慌、胸闷、呼吸急促、大汗淋漓、血压降至 55/25 mmHg (7.5/3.5 kPa)。立即停药, 给予肾上腺素、地塞米松、异丙嗪等药物抢救, 20 min 后症状消失。次日改用磷霉素钠 6.0 g + 500 ml 等渗葡萄糖注射液静脉滴注, 其等渗葡萄糖

注射液和一次性输液器均与前日所用的是同一厂家、同一批号的产品。再滴以甲硝唑 250 ml 分别静脉滴注, 连用 5 d 扁桃体炎痊愈。

该例患者属于高敏体质, 因而考虑为林可霉素引起的过敏性休克, 故提醒广大医护人员, 在临床使用林可霉素过程中应提高警惕, 密切观察, 特别对高敏体质的患者更应引起高度重视。

(收稿日期: 2004-02-16)