

NF- κ B 水平在大鼠血液高凝态下的变化

王立文¹, 沈晓洁^{1*}, 何文涓¹, 吴倩², 嵇莹莹², 龚国清²

(¹ 无锡卫生高等职业技术学校护理系, 江苏 无锡 214028; ² 中国药科大学药学院药理系, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的: 观察核因子 κ B(NF- κ B)水平在大鼠血液高凝态下的变化, 为血栓疾病的防治探索新靶点。方法: 大鼠 80 只随机分为模型组与生理盐水组, 模型组以预实验确定的最适剂量盐酸肾上腺素造模, 于 12、18、24、48、96 h 各组随机取 8 只大鼠颈动脉取血测凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、全血黏度, 并采用酶联免疫吸附法测 NF- κ B 水平。结果: 0.7 mg/kg 肾上腺素造模模型复制成功率高, 大鼠死亡率低, 为最佳造模剂量。生理盐水组 PT、APTT、全血黏度及 NF- κ B 水平在各时间点无统计学差异; 模型组 PT、APTT 较生理盐水组缩短($P < 0.05$), 但随时间缓慢延长, 全血黏度及 NF- κ B 水平较生理盐水组增大($P < 0.05$), 但随时间缓慢降低, 且在 12、18 h 时 PT、APTT 同生理盐水组比较有显著差异($P < 0.05$), 24 h 内全血黏度较生理盐水组显著增大($P < 0.05$), 48 h 内 NF- κ B 水平较生理盐水组显著升高($P < 0.05$)。结论: 高凝态大鼠血液中 NF- κ B 水平显著升高, 并随着高凝态的消退而降低, 说明大鼠血液高凝态的发生、发展可能与 NF- κ B 信号通路表达上调有关。

[关键词] 高凝态; NF- κ B; 大鼠

[中图分类号] R963

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)08-990-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20170814

Changes of NF- κ B in rat blood hypercoagulable state

Wang Liwen¹, Shen Xiaojie^{1*}, He Wenjuan¹, Wu Qian², Ji Yingying², Gong Guoqing²

(¹Department of Nursing, Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi 214028; ²Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To verify changes of NF- κ B in hypercoagulable state of rats and find new targets to treat thrombotic diseases. **Methods:** Eighty rats were split into model group and control group. The model group was injected with adrenaline hydrochloride at the dosage determined in pre-experiment, while the control group was injected with normal saline. After 12, 18, 24, 48 and 96 h, eight rats of each group were anaesthetized to collect blood sample. Preparing plasma samples were prepared to test PT, APTT, and the whole blood viscosity, and serum were collected to test the level of NF- κ B. **Results:** In the pre-experiment, death rate of the model group of 0.7 mg/kg was lower, and compared with the control group, PT and APTT were shorter ($P < 0.05$) and the whole blood viscosity was higher ($P < 0.05$); The model group showed distinct differences on PT and APTT compared with the control group at time of 12 h and 18 h ($P < 0.05$), the whole blood viscosity of the model group is higher than that of the control group within 24 h, and the level of NF- κ B of the model group is higher than that of the control group within 48 h. **Conclusion:** The best dosage of adrenaline is 0.7 mg/kg. Level of NF- κ B in rats with hypercoagulable state is higher than that of the control group, which decreases with time. The hypercoagulable state in rats may be related to the increasing expression of NF- κ B pathway.

[Key words] hypercoagulable state; level of NF- κ B; rats

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(08):990-993]

血栓前状态(prethrombotic state, PTS)即高凝态, 是各种因素引起的凝血、止血和抗凝系统失衡的一

种病理过程, 具有容易引发血栓形成的多种血液学变化^[1]。高凝态常常继发于肿瘤、糖尿病肾病、高脂血症等多种疾病, 但目前对于高凝态的形成机制尚不清楚, 因此深入研究其发病机制对于高凝态的防治和其他多种疾病的辅助治疗具有重要的临床意

[基金项目] 无锡市医院管理中心科研项目(YGZXMI533)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wxwxsxj@sina.com

义。研究发现,核因子 κ B(NF- κ B)信号通路在炎症、免疫、细胞的生存、增殖分化和凋亡等生理病理过程中具有广泛而重要的作用^[2]。此外,NF- κ B 可能转录调控血管内皮细胞组织因子(TF)的表达,上调外源性凝血系统的启动因子,活化凝血系统的一系列反应,使血液向血栓前状态改变。而防治高凝态的药物研究中,临床前实验通常使用动物模型模拟人体病理状态下的高凝态,急性血瘀模型是比较成熟的高凝态模型^[3]。本研究旨在探索 NF- κ B 在大鼠高凝态下的变化,为高凝态和血栓疾病的预防治疗寻找可能的新靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

SD 大鼠 112 只,雌雄各半,体重(200±20) g,由浙江省实验动物中心提供 [合格证号:SCXK (浙)2014-0001]。所有动物于实验开始 1 周前开始适应新环境,保持 12 h 光照、12 h 黑暗的正常昼夜节律,自由饮水取食,温度 20~26 °C,相对湿度 45%~75%。

盐酸肾上腺素注射液(批号:10141102,上海禾丰制药有限公司);水合氯醛(批号:20150303,国药集团化学试剂有限公司);柠檬酸三钠(无锡市民丰试剂厂);凝血酶原时间(PT)试剂盒(冻干型,批号:105252,上海太阳生物技术有限公司);活化部分凝血活酶时间(APTT)试剂盒(批号:112176,上海太阳生物技术有限公司);大鼠 NF- κ B 酶联免疫分析试剂盒(批号:201505,南京森贝伽生物科技有限公司)

台式离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);AYW8003 半自动凝血分析仪(南京瑞麦科技开发有限公司);酶标仪(Bio-Rad 680);分析天平(上海民桥精密科学仪器有限公司);XW-80A 涡旋混合仪(上海沪西分析仪器有限公司);SA-5600 自动血流变测试仪(北京赛科希德科技发展有限公司);常用玻璃、手术器皿等用具。

1.2 方法

1.2.1 盐酸肾上腺素剂量确定

将 32 只 SD 大鼠随机分为 A、B、C、D 4 组,雌雄各半。A、B、C 组分别皮下注射盐酸肾上腺素溶液 0.6、0.7、0.8 mg/kg 2 次,间隔时间为 4 h,并于第 1 次注射后 2 h 时将大鼠置于 4 °C 水浴游泳 4 min。D 组皮下注射等体积生理盐水 2 次,间隔 4 h,于第 1 次注射后给予常温水浴游泳 4 min。禁食不禁水 12 h 后,分别于颈总动脉采集血样制备血浆样品及全血样品,血浆用于测试 PT、APTT^[4],全血样品测试全血

黏度^[5]。

1.2.2 高凝态模型建立后各时间点 NF- κ B 含量测定

80 只大鼠随机分为生理盐水组(I 组)和肾上腺素组(II 组),每组 40 只,雌雄各半。I 组生理盐水加常温水浴处理,II 组最适剂量肾上腺素加 4 °C 冰浴处理。于第 2 次注射给药后 12、18、24、48、96 h 各组随机抽取 8 只大鼠,雌雄各半,颈总动脉取血,分别制备血浆、血清、全血样品,血浆样品用于测定 PT、APTT,血清样品采用酶联免疫吸附法测定 NF- κ B 水平^[6],全血样品测定血液黏度。

1.3 统计学方法

数据采用 SPSS19.0 进行统计学分析,所有数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多样本间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 SNK 法, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 盐酸肾上腺素剂量确定

各组大鼠皮下注射肾上腺素或生理盐水后,PT 结果:同 D 组 [(13.67±0.48)s] 相比,A 组 [(13.20±0.63)s] 无统计学差异,B 组 [(12.98±0.27)s]、C 组 [(12.17±0.32)s] 显著缩短($P<0.05$)。APTT 结果:同 D 组 [(24.93±0.84)s] 相比,A 组 [(22.80±0.63)s] 无统计学差异,B 组 [(20.70±0.80)s]、C 组 [(19.87±0.38)s] 显著缩短($P<0.05$)。各组全血黏度见表 1,A 组在各剪切力下全血黏度同 D 组无差异,而 B 组在低切与中切时全血黏度较 D 组显著增大($P<0.05$),C 组在高、中、低切时全血黏度较 D 组均显著增大($P<0.05$)。A、B、D 3 组大鼠在造模过程中无死亡现象,C 组 3 只大鼠在第 2 次注射肾上腺素后 5 min 内发生猝死,死亡率为 37.5%。

2.2 造模后各时间点血浆 PT、APTT 及全血黏度

II 组(0.7 mg/kg 肾上腺素造模组)大鼠血浆 PT、APTT 值在 18 h 内较 I 组显著缩短($P<0.05$),24、48、96 h 时与 I 组无统计学差异(图 1A、B)。II 组大鼠全

表 1 皮下注射不同剂量肾上腺素大鼠全血黏度及死亡情况
Table 1 Whole blood viscosity and death rate of rats after subcutaneous injection with adrenaline at different dosage

组别	$(\bar{x}\pm s)$		
	低切(5/s)	中切(30/s)	高切(200/s)
A 组(n=8)	16.21±0.65	7.80±0.37	5.49±0.40
B 组(n=8)	18.11±0.96*	9.20±0.31*	6.00±0.40
C 组(n=5)	18.67±0.94*	9.86±0.33*	6.35±0.39*
D 组(n=8)	14.80±1.01	7.66±0.81	5.39±0.34

与 D 组比较,* $P<0.05$ 。

血黏度较 I 组增大,但随时间而缓慢降低,在 24 h 内全血黏度在低切和中切时较 I 组显著增大 ($P < 0.05$),48、96 h 时全血黏度与 I 组无差异(表 2)。

2.3 造模后各时间点 NF-κB 水平

I 组各时间点 NF-κB 水平 [(15.01±5.93) ng/L] 无明显变化; II 组血清 NF-κB 水平较 I 组升高,但随时间缓慢降低,在 12 h [(209.27±10.13) ng/L]、18 h [(204.12±7.26) ng/L]、24 h [(162.36±14.84) ng/L]、48 h [(88.21±17.38) ng/L]较 I 组显著升高($P < 0.05$),在 96 h [(34.45±15.98) ng/L]同 I 组无统计学差异(图 1C)。

表 2 造模后组与 II 组各时间点大鼠全血黏度

Table 2 Whole blood viscosity of rats blood of group I and group II at every time point after modeled (n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	低切(5/s)	中切(30/s)	高切(200/s)
I 组	14.86±0.66	7.65±0.53	5.54±0.42
II 组(12 h)	17.84±0.66*	9.40±0.52*	6.07±0.42
II 组(18 h)	17.49±0.43*	9.18±0.45*	5.96±0.44
II 组(24 h)	16.87±0.58*	8.31±0.39*	5.73±0.25
II 组(48 h)	16.61±0.71	8.03±0.40	5.56±0.28
II 组(96 h)	15.58±0.78	7.53±0.37	5.40±0.25

同 I 组比较,* $P < 0.05$ 。

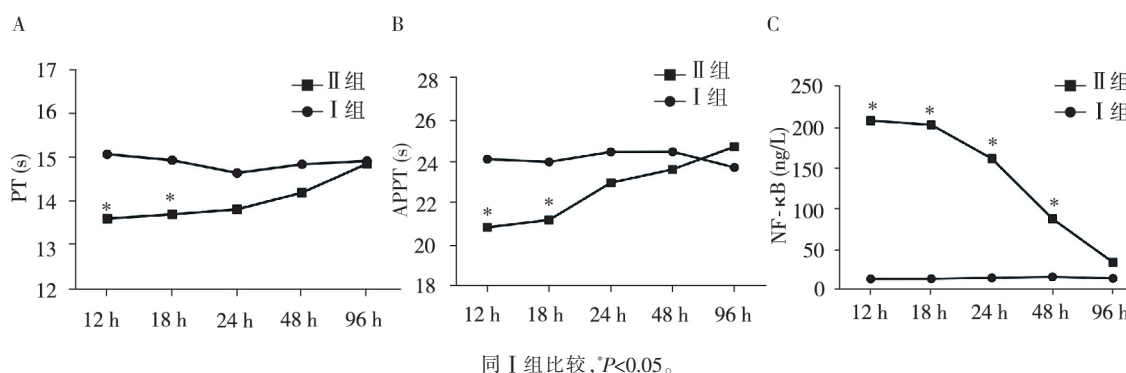


图 1 造模后两组大鼠各时间点血浆 PT 值(A)、APPT 值(B)和血清 NF-κB 水平(C)

Figure 1 PT value(A),APPT value(B) in rats plasma and quantity of NF-κB (C) in rats serum at every point of the two groups

3 讨论

临床上,血管血栓性疾病是多发病和常见病,对人类的身体健康有极大威胁[7]。研究发现,血栓疾病患者的血液存在高凝状态,其血小板活化、凝血因子激活,活化蛋白 C 的抗凝活性受抑制等[8]。而高凝态具有容易引发血栓形成的多种血液学变化,并且常常作为继发性症状伴随其他疾病发生,如地中海贫血症、乳腺癌、甲状腺功能减退、席汉氏综合征等[9-11]。因此通过抑制血液高凝态的生成可以有效降低血栓性疾病的发病率,对其他相关疾病亦有辅助治疗作用。

在临床前研究中,常常通过建立动物的高凝态模型来模拟人类的血栓前状态。常用的模型有肾上腺素模型、右旋糖酐模型、高脂血症模型等[12]。其中肾上腺素模型源于中医理论,认为“忧怒”和“寒邪”为急性血瘀(高凝态)的主要病因,以皮下注射肾上腺素模拟暴怒时机体释放肾上腺素,以冰水浴模拟“寒邪”入侵[3],从而复制高凝态模型,该造模方法简便易行、模型复制成功率高。李伟霞等[3]研究发现,雌性大鼠皮下注射 0.8 mg/kg 肾上腺素加 4 ℃冰浴游泳 4 min,造模后 12 h 时模型复制成功率较高,但

在本研究中发现该造模条件下大鼠在第 2 次注射肾上腺素时发生猝死,且死亡率较高,因此在研究中需要对肾上腺素的剂量进行摸索。

NF-κB 家族转录因子在损伤和感染所致的免疫、炎症进程中起着调控作用,内在受体激活后,细胞膜上发生的一系列反应导致 IκB 激酶(IKK)激活,从而使胞内 NF-κB 活化并入核调节相关基因的转录和表达[13]。NF-κB 信号通路参与多种病理生理过程,如控制血管祖细胞的分型、参与病毒抑制机体免疫过程、促进癌症的发生发展等[14-16]。此外,研究发现部分肿瘤患者易并发深静脉血栓(DTV),这些患者中 NF-κB 活化水平较无 DTV 的肿瘤患者要显著升高[17];在脂多糖诱导的单核巨噬细胞中,使用黄连素可抑制 NF-κB、Akt、MAPK/JNK/p38/ERK 信号通路的表达,进而下调 TF 水平,而抑制炎症和凝血过程[18];研究发现在大多数肺炎患者中凝血酶水平有显著升高,凝血酶可诱导人肺内皮细胞中 NF-κB 活化和白介素-8 释放[19];凝血因子 Xa 能够促进内皮细胞 TF 的表达,而 TF 又参与 NF-κB 的转录及 P65 的转移入核,通过 IKK 抑制剂抑制 IκBα 的磷酸化能够阻断因子 Xa 诱导的 TF 表达[20]。因此推测 NF-κB

可能与血栓和高凝态的发生发展过程密切相关。

本研究参考李伟霞等^[3]的研究采用肾上腺素+冰浴法造高凝态模型,以 PT、APTT 和全血黏度为高凝态观测指标,观察在大鼠高凝态下 NF- κ B 水平的变化。首先对肾上腺素的造模剂量进行摸索,设置低、中、高 3 个剂量组,考察造模情况与大鼠的死亡情况,结果表明中剂量(0.7 mg/kg)肾上腺素造模组模型复制成功率高、大鼠死亡率低,为本研究的最佳造模剂量。然后设置模型组和对对照组分别给予 0.7 mg/kg 肾上腺素和生理盐水皮下注射造模,于造模后各时间点取血测量凝血、血液黏度指标及 NF- κ B 含量,考察造模后血液中 NF- κ B 水平同高凝态进程的关系。结果显示,在该模型中大鼠血液高凝态与 NF- κ B 表达上调有关,造模后模型组大鼠血清 NF- κ B 较对照组显著升高,但在 96 h 内随着造模后时间推移,血液由高凝态趋于正常的同时 NF- κ B 随之降低。由此可知,大鼠血液高凝态的形成与 NF- κ B 水平的提高有关,进而推测 NF- κ B 信号通路的活化可能是高凝态形成的原因之一,通过抑制 NF- κ B 信号通路的表达可以抑制血液高凝态的形成,从而获得预防血栓疾病的作用,这也为今后相关的研究提供一个新靶点。

[参考文献]

[1] 叶跃红,李兴禄. 血栓前状态实验室诊断指标研究[J]. 重庆医学,2005,34(3):367-368

[2] 史艳晖,卢圣栋. 转录因子 NF- κ B 的研究现状及其应用前景[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(4):110-114

[3] 李伟霞,黄美艳,唐于平,等. 大鼠急性血瘀模型方法的研究与评价[J]. 中国药理学通报,2011,27(12):1761-1765

[4] Jain A,Gupta N,Singh T,et al. A Study of haemostatic parameters in patients of chronic myeloid leukaemia[J]. J Clin Diagn Res,2016,10(7):19-23

[5] Tian H,Wang Q. Quantitative analysis of microcirculation blood perfusion in patients with hepatocellular carcinoma before and after transcatheter arterial chemoembolisation using contrastenhanced ultrasound[J]. Eur J Cancer,2016,68:82-89

[6] Sun Z, Yan B, Yu WY, et al. Vitexin attenuates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via the suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis and the activation of FOXO3a[J]. Exp Ther Med,2016,12(3):1879-1884

[7] 李家增. 血管血栓性疾病的发病机制和防治[J]. 基础医学与临床,2006,26(6):561-565

[8] Jeong JC, Kim JE, Ryu JW, et al. Plasma haemostatic po-

tential of haemodialysis patients assessed by thrombin generation assay: Hypercoagulability in patients with vascular access thrombosis [J]. Thromb Res,2013,132(5):604-609

[9] Samia AE, Nadia AS, Sanaa A, et al. Plasma substance P and soluble P-selectin as biomarkers of b-thalassemia induced hypercoagulability[J]. Alexandria J Med,2014,50(2):107-111

[10] Chaari M, Ayadi I, Rousseau A, et al. Impact of breast cancer stage, time from diagnosis and chemotherapy on plasma and cellular biomarkers of hypercoagulability [J]. BMC Cancer,2014,14:991

[11] Mir SA, Masoodi SR, Wani AI, et al. Deep vein thrombosis in a patient of Sheehan's syndrome: Autoimmunity or hypercoagulability[J]. Indian J Endocrinol Metab,2016,17(Suppl 1):S105-S106

[12] 宋程程,王志斌,苏斌,等. 常用大鼠血瘀证模型的研究[J]. 北京中医药大学学报,2014,37(2):94-98

[13] Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF- κ B Signaling [J]. Annu Rev Biophys,2013,42:443-468

[14] Wong MM, Chen Y, Margariti A, et al. Macrophages control vascular stem/progenitor cell plasticity through tumor necrosis factor- α -mediated nuclear Factor- κ B activation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2014,34(3):635-643

[15] Liang C, Oh BH, Jung JU. Novel functions of viral anti-apoptotic factors[J]. Nat Rev Microbiol,2015,13(1):7-12

[16] Tong L, Yuan Y, Wu S. Therapeutic microRNAs targeting the NF-kappa B signaling circuits of cancers [J]. Adv Drug Deliv Rev,2015,81:1-15

[17] Malaponte G, Signorelli SS, Bevelacqua V, et al. Increased levels of NF-kB-Dependent markers in cancer-associated deep venous thrombosis[J]. PLoS One, 2015,10(7):e0132496

[18] Gao MY, Chen L, Yang L, et al. Berberine inhibits LPS-induced TF procoagulant activity and expression through NF-kB/p65, Akt and MAPK pathway in THP-1 cells[J]. Pharmacol Rep,2014,66(3):480-484

[19] Lin CH, Yu MC, Chiang CC, et al. Thrombin-induced NF- κ B activation and IL-8/CXCL8 release is mediated by c-Src-dependent Shc, Raf-1, and ERK pathways in lung epithelial cells [J]. Cell Signal, 2013,25(5):1166-1175

[20] Jiang R, Wang NP, Tanaka KA, et al. Factor Xa induces tissue factor expression in endothelial cells by P44/42 MAPK and NF- κ B-Dependent pathways[J]. J Surg Res, 2011,169(2):319-327

[收稿日期] 2016-07-19