

• 基础研究 •

临床相关浓度硫喷妥钠对大鼠脑胶质瘤细胞核因子- κ B 活性的影响范婷¹, 安建雄¹, 杜培革²

[摘要] 目的 探讨临床相关浓度的硫喷妥钠及其不同作用时间对大鼠脑胶质瘤细胞核因子(NF)- κ B 活性的影响。方法 取大鼠脑胶质瘤 C₆ 细胞株,分别与 10^{-3} mol/L、 10^{-4} mol/L、 10^{-5} mol/L 硫喷妥钠作用 1 h,在收集细胞前 30 min 用 10 ng/ml 脂多糖进行处理;取大鼠脑胶质瘤 C₆ 细胞株,分别与 10^{-5} mol/L 硫喷妥钠作用 0.5 h、1 h、2 h、4 h,在收集细胞前 30 min 用脂多糖进行处理。提取细胞总 RNA,逆转录得到 cDNA,之后行 PCR 反应;NF- κ B 表达结果进行凝胶电泳分析(EMSA)并用 Bio-Rad 密度仪进行半定量分析。结果 经 10^{-3} mol/L、 10^{-4} mol/L、 10^{-5} mol/L 硫喷妥钠处理的电泳带窄于对照,密度测量值低于对照($P < 0.05$),但各处理浓度之间密度测量值的无显著性差异。经 10^{-5} mol/L 硫喷妥钠作用 0.5 h、1 h、2 h、4 h 的各电泳带宽度依次递减,亮度依次递减,密度测量数值也依次递减($P < 0.05$),且低于对照($P < 0.05$)。结论 硫喷妥钠对脑胶质瘤细胞 NF- κ B 活性具有明显影响。这种影响与硫喷妥钠浓度无关,随硫喷妥钠作用时间的延长而增强。

[关键词] 核因子- κ B(NF- κ B);胶质瘤细胞;硫喷妥钠;浓度;作用时间

Effect of Thiopental on Nuclear Factor Kappa B in Rat Glioma Cells FAN Ting, AN Jian-xiong, DU Pei-ge. Department of Anaesthesiology, Tsinghua University Yuquan Hospital, Beijing 100049, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of thiopental on lipopolysaccharide (LPS)-induced activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) under different concentration or after different time in rat glioma cells in vitro. **Methods** The rat C₆ glioma cells were treated with, in the presence or absence of various concentrations (10^{-3} mol/L, 10^{-4} mol/L and 10^{-5} mol/L) of thiopental for 1 h. 30 min before harvest, the cells were exposed to LPS(10 ng/ml). The other C₆ cells were treated with 10^{-5} mol/L thiopental with different time (0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h). 30 min before harvest, the cells were exposed to LPS(10 ng/ml). Nuclear extracts from C₆ cells were harvested using standard procedures, and the LPS-induced NF- κ B expression was determined with electrophoretic mobility shift assays (EMSA) and measured with densitometry (Bio-Rad). **Results** The width of the bands of NF- κ B under thiopental with different concentrations were similar, but they were narrower than that of the control (treated only with LPS), the density was less than that of the control ($P < 0.05$). The width of the bands of NF- κ B under thiopental with different time decreased with the time ($P < 0.05$), and they were much narrower and shallower than that of the control ($P < 0.05$), and the density was significantly less than that of the control ($P < 0.05$). **Conclusion** Thiopental suppressed the activation of transcription factor NF- κ B, and the inhibition was concentration-independent but time-dependent.

Key words: nuclear factor kappa B (NF- κ B); glioma cell; thiopental; concentration; time

[中图分类号] R651.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2008)05-0440-02

[本文著录格式] 范婷,安建雄,杜培革.临床相关浓度硫喷妥钠对大鼠脑胶质瘤细胞核因子- κ B 活性的影响[J].中国康复理论与实践,2008,14(5):440-441.

核转录因子核因子(NF)- κ B 是一类多向性核转录调节蛋白,其活性的增加可能是感染、失血、缺血-再灌注等引起多器官功能衰竭的中心环节,可以诱导危重患者发生急性炎症反应综合症。既有资料提示,硫喷妥钠对 NF- κ B 活性的增加有明显的抑制作用,但各文献中所采用的硫喷妥钠浓度与临床使用浓度相差悬殊。那么,临床相关浓度的硫喷妥钠对 NF- κ B 活性是否有影响?这种影响是否与作用时间有关?脑胶质瘤(glioma)是神经外科肿瘤中最为常见的一种,伴随肿瘤生长常同时存在颅内感染和颅内压的增高。而在围手术期处理颅内压过度增高的一种常见办法是硫喷妥钠静脉注射。本研究通过观察不同浓度及不同作用时间的硫喷妥钠对 NF- κ B 活性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂 低温冰箱: Sanyo 公司;

作者单位:1. 清华大学玉泉医院麻醉与疼痛医学科,北京市 100049;2. 北华大学医学院,吉林吉林市 132011。作者简介:范婷(1973-),女,吉林吉林市人,硕士,主治医师,主要研究方向:麻醉深度监测、疼痛治疗。

Polystat CCL 型恒温水浴箱: Huber 公司;微量加样器: Gilson 公司;Centrifuge5415 台式低温离心机: Deppendorf 公司;A200S 电子分析天平: Sartorius 公司;Pall PL 5124L 180224 超纯水系统: 英国;硫喷妥钠粉剂: 协和发酵公司;UA-160 A 型紫外分光光度计: Shimadzu 公司;BH-2 型光学显微镜: Olympus 公司。

1.1.2 生物材料 纯 C₆ 大鼠脑胶质瘤细胞株由日本弘前大学神经解剖教研室提供;NF- κ B 引物由日本 グライナ株式会社合成。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 C₆ 大鼠脑胶质瘤细胞系于 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 中进行培养, DMEM 成分为: 4.5% 葡萄糖、10% 乳牛血清(fetal calf serum, FCS)、110 mg/L 丙酮酸钠、10 mmol/L L-谷氨酸钠、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素(penicillin & streptomycin, PS)。恒温箱温度设定为 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 浓度控制在 5%。

1.2.2 细胞处理 将 C₆ 细胞植于 10 cm 组织培养皿中(Costar, Cambridge MA, USA),细胞密度为 10^6 。

1.2.2.1 不同浓度硫喷妥钠的影响 除一皿留作对照外,其余各皿分别加入 10^{-3} mol/L、 10^{-4} mol/L、

10^{-5} mol/L 硫喷妥钠作用 1 h; 在收集细胞前 30 min, 各皿均用 10 ng/ml 脂多糖(LPS) 进行处理。

1.2.2.2 不同作用时间硫喷妥钠的影响 除一皿留作对照外, 其余各皿加入 10^{-5} mol/L 硫喷妥钠分别作用 0.5 h、1 h、2 h、4 h; 在收集细胞前 30 min, 各皿均用 10 ng/ml LPS 进行处理。

1.2.3 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) C_6 细胞总 RNA 提取、RT 反应 (cDNA 制备) 依照标准程序进行。订购两对合成的 NF- κ B 引物如下: 上游引物 1: 5'-ATG ACC TGG ACG ACT CTT GG-3'; 下游引物 1: 5'-GCT GTC TTG TGG AGG AGG AG-3'; 上游引物 2: 5'-CTC TCG TCC TCC TCC ACA AG-3'; 下游引物 2: 5'-GAG GGA CAG CAG TGA CAA CA-3'。

于 PCR 专用试管中依次加入 Taq Master Mix 10 μ l, 上游引物 1 μ l, 下游引物 1 μ l, PCR 专用 distilled H_2O 6 μ l 及制备好的 cDNA 样本共计 20 μ l, 依照标准程序进行 24 循环扩增反应。每一循环程序为: 95 $^{\circ}C$ 15 min, 95 $^{\circ}C$ 20 s, 60 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 90 s, 24 个循环后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。

1.2.4 凝胶电泳分析 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) 将 PCR 反应产物染色后, 分别加于 4% 聚丙烯酰胺凝胶开始电泳 (50 mA), 室温下泳动 45 min (10 V/cm) 后, 行紫外线摄像, 并用 Bio-Rad 密度分析仪 (FootLook and Molecular Analyst Software Program, Hercules) 进行半定量分析。

1.3 统计学方法 用 SigmaStat 2.03 统计软件进行统计学处理。测量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 Repeated-measures analysis of variance 进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

10^{-3} mol/L、 10^{-4} mol/L、 10^{-5} mol/L 硫喷妥钠作用 1 h, NF- κ B 密度测量值分别为 (576.33 ± 116.64) mm^2 、(539.00 ± 131.07) mm^2 、(541.17 ± 129.34) mm^2 , 明显低于对照 (659.00 ± 95.44) mm^2 ($P < 0.05$), 但各浓度之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

经 10^{-5} mol/L 硫喷妥钠分别作用 0.5 h、1 h、2 h、4 h 后, NF- κ B 密度测量值分别为 (532.83 ± 73.20) mm^2 、(436.67 ± 76.31) mm^2 、(356.50 ± 59.04) mm^2 、(294.67 ± 43.29) mm^2 , 均低于对照密度值 (676.33 ± 83.22) mm^2 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 作用 4 h 组也低于作用 0.5 h、1 h 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

近年来, 有报道提示硫喷妥钠可能对脑胶质瘤细胞内 NF- κ B 的表达产生抑制作用^[1-2]。如果属实, 那

么硫喷妥钠将可用作全麻药和降颅压用药, 甚至可能作为抑制炎症、免疫反应的药物应用于临床。Ichiyama 等^[1]和 Loop 等^[2]分别研究了不同浓度的硫喷妥钠对人胶质瘤细胞 (A-172 细胞) 及人血液 T 淋巴细胞 NF- κ B 的活性的影响, 虽然他们所使用的硫喷妥钠浓度相差很多, 但均得出了肯定的结论。

本研究从作用浓度和作用时间两个方面分别探讨了硫喷妥钠对大鼠脑胶质瘤细胞内 NF- κ B 活性的影响。结果提示, 硫喷妥钠对 NF- κ B 的抑制程度不受硫喷妥钠浓度变化的影响, 但作用时间越长, NF- κ B 活性受抑制的程度越强; 硫喷妥钠对 NF- κ B 的抑制程度呈现明显的时间依赖性。

NF- κ B 由两个亚单元 (subunit) 组成, 与其抑制因子 I κ B (inhibitor of κ B) 蛋白质结合存在于胞浆中。当细胞接触活化因子如内毒素、炎性细胞活素或肿瘤坏死因子 (TNF- α) 结合到细胞表面受体时, I κ B 蛋白质 32 和 34 位丝氨酸被磷酸化, 经过泛素化修饰后蛋白水解。I κ B 水解脱落后, NF- κ B 复合体移至细胞核内, 并结合至基因启动区的结合位点。激活的 NF- κ B 促进炎性细胞活素的产生和释放^[3], 这些新产生的炎性细胞活素反过来又刺激增加 NF- κ B 活性^[4]。既往研究提示, 硫喷妥钠抑制 NF- κ B 活性的机理在于抑制了 I κ B α 蛋白的水解^[1]及抑制 κ B 激酶的活性^[5]。

本研究使用的硫喷妥钠浓度接近于临床硫喷妥钠血浆浓度水平 (7 ~ 60 μ mol/L)^[6]。而 Loop 等使用的浓度为 200 ~ 1000 μ g/ml^[2], 远大于临床相关浓度, 在这一浓度水平上, 患者的循环可能很难维持。

神经外科患者在围手术期处于昏睡状态时间较长, 不论是药物、肿瘤或外伤引起的昏睡都可能增加患者炎症感染的机会。NF- κ B 是调节诸多炎性因子产生的重要因素, 抑制 NF- κ B 的活性即意味着有害炎性致病因子产生的减少。

[参考文献]

- [1] Ichiyama T, Nishikawa M, Lipton JM, et al. Thiopental inhibits NF- κ B activation in human glioma cells and experimental brain inflammation[J]. Brain Res, 2001, 911(1): 56-61.
- [2] Loop T, Liu Z, Humar M, et al. Thiopental inhibits the activation of nuclear factor kappa B[J]. Anesthesiology, 2002, 96(5): 1202-1213.
- [3] Guerrini L, Blasi F, Denis-Donini S. Synaptic activation of NF- κ B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 9077-9081.
- [4] Moynagh PN, Williams DC, O'Neill LA. Interleukin-1 activates transcription factor NF- κ B in glial cells[J]. Biochem J, 1993, 294: 343-347.
- [5] Loop T, Humar M, Pischke S, et al. Thiopental inhibits tumor necrosis factor alpha-induced activation of nuclear factor kappa B through suppression of kappa B kinase activity[J]. Anesthesiology, 2003, 99(2): 360-367.
- [6] Martynuk AE, Morey TE, Raatikainen MJP, et al. Ionic mechanisms mediating the differential effects of methohexital and thiopental on action potential duration in guinea pig and rabbit isolated ventricular myocytes[J]. Anesthesiology, 1999, 90: 156-164.

(收稿日期: 2008-01-21)