

文章编号:1000-5404(2012)15-1509-05

论著

## TNF- $\alpha$ 激活 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制培养成纤维细胞 SDF-1 $\alpha$ 分泌

张玉龙<sup>1</sup>, 毋巨龙<sup>1</sup>, 杨忠<sup>2</sup>, 丁可<sup>3</sup>, 李世荣<sup>1</sup> (400038 重庆, 第三军医大学: 西南医院整形美容科<sup>1</sup>, 基础医学部神经生物学教研室, 重庆市神经科学研究所<sup>2</sup>, 西南医院骨科, 全军矫形外科中心<sup>3</sup>)

**[摘要]** 目的 探讨肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 激活核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路对成纤维细胞生物学行为的影响。  
**方法** 小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)进行体外培养, 将细胞分为 TNF- $\alpha$  组、TNF- $\alpha$  + 吡咯烷二硫氨基甲酸(PDTC)组及对照组, 处理后的细胞采用 CCK-8 方法检测细胞增殖情况、Western blot 和细胞免疫荧光检测 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达与定位、ELISA 检测基质细胞衍生因子-1 $\alpha$ (SDF-1 $\alpha$ )的分泌。  
**结果** TNF- $\alpha$  在一定浓度范围内对成纤维细胞起到明显的促增殖作用, CCK-8 检测显示 TNF- $\alpha$  组在不同浓度和不同时相点 MEF 的光密度值与 TNF- $\alpha$  + PDTC 组及对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ); 免疫荧光染色显示 I $\kappa$ B $\alpha$  主要分布于细胞质, TNF- $\alpha$  组与对照组和 TNF- $\alpha$  + PDTC 组相比, I $\kappa$ B $\alpha$  荧光强度明显减弱。Western blot 结果发现 TNF- $\alpha$  刺激后 30 min, TNF- $\alpha$  组和 TNF- $\alpha$  + PDTC 组 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达 [(3 070.0  $\pm$  39.0) vs (1 421.7  $\pm$  75.3), (3 212.2  $\pm$  57.5) vs (1 468.2  $\pm$  45.8)],  $P < 0.05$ ] 均降至最低值, 随时间推移逐渐恢复, TNF- $\alpha$  + PDTC 组 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达显著高于 TNF- $\alpha$  组 [(3 112.3  $\pm$  89.7) vs (2 610.4  $\pm$  26.9)],  $P < 0.05$ ]; ELISA 检测发现 TNF- $\alpha$  作用后成纤维细胞 SDF-1 $\alpha$  的分泌呈减少趋势 [(15.9  $\pm$  1.6) vs (12.7  $\pm$  0.6)],  $P < 0.05$ ], TNF- $\alpha$  + PDTC 组则能显著逆转 TNF- $\alpha$  作用 [(23.5  $\pm$  3.2) vs (15.0  $\pm$  1.2)], (21.6  $\pm$  0.4) vs (12.7  $\pm$  0.6)],  $P < 0.05$ ], 促进 SDF-1 $\alpha$  分泌。  
**结论** TNF- $\alpha$  能通过激活 NF- $\kappa$ B 通路, 影响小鼠胚胎成纤维细胞的增殖并抑制 SDF-1 $\alpha$  分泌。

**[关键词]** 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 核因子- $\kappa$ B; 小鼠胚胎成纤维细胞; 吡咯烷二硫氨基甲酸

**[中图分类号]** R329.33; R329.25; R364.3

**[文献标志码]** A

## TNF- $\alpha$ inhibits SDF-1 $\alpha$ secretion in cultured fibroblasts through activating NF- $\kappa$ B signaling pathway

Zhang Yulong<sup>1</sup>, Wu Julong<sup>1</sup>, Yang Zhong<sup>2</sup>, Ding Ke<sup>3</sup>, Li Shirong<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Plastic and Cosmetic Surgery, <sup>3</sup>Department of Orthopedics, Southwestern Hospital; <sup>2</sup>Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) on the biological behaviors of cultured fibroblasts and its relevant nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). **Methods** Mouse embryonic fibroblasts (MEF) were cultured and treated with TNF- $\alpha$  or TNF- $\alpha$  plus pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) respectively. Cell proliferation were analyzed by CCK-8 method and flow cytometry. The levels of I $\kappa$ B $\alpha$  in the cytoplasm were examined with Western blotting and immunofluorescence staining. The secretion of SDF-1 $\alpha$  was measured through ELISA. **Results** TNF- $\alpha$  promoted the proliferation of MEF in a concentration-dependent manner, the result of CCK-8 showed that the absorbance in TNF- $\alpha$  group was significantly higher than that in TNF + PDTC group and control group ( $P < 0.05$ ). Immunofluorescence staining showed that I $\kappa$ B $\alpha$  was mainly distributed in the cytoplasm, and fluorescent intensity of I $\kappa$ B $\alpha$  in the TNF- $\alpha$  group was decreased significantly when compared with control and the TNF- $\alpha$  + PDTC group. Western blotting indicated that the expression of I $\kappa$ B both in the TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  + PDTC group was dropped to a minimum value in 30 min after treatment (3 070.0  $\pm$  39.0 vs 1 421.7  $\pm$  75.3, 3 212.2  $\pm$  57.5 vs 1 468.2  $\pm$  45.8,  $P < 0.05$ ), then gradually increased and restored to near normal level around 4 h. The expression of I $\kappa$ B in TNF- $\alpha$  + PDTC group was significantly higher than that of TNF- $\alpha$  group (3 112.3  $\pm$  89.7 vs 2 610.4  $\pm$  26.9,  $P < 0.05$ ). The secretion of SDF-1 $\alpha$  in MEF was decreased upon the treatment of TNF- $\alpha$  (15.9  $\pm$  1.6 vs 12.7  $\pm$  0.6,  $P < 0.05$ ), TNF- $\alpha$  + PDTC

**[基金项目]** 重庆市自然科学基金(CSTC 2009BB5146)

**[通信作者]** 李世荣, 电话: (023)68754192, E-mail: zhengxing@vip.163.com

毋巨龙, 电话: (023)68765350, E-mail: wj03310@tom.com

group exerted opposite effect ( $23.5 \pm 3.2$  vs  $15.0 \pm 1.2$ ,  $21.6 \pm 0.4$  vs  $12.7 \pm 0.6$ ,  $P < 0.05$ ) and improved SDF-1 $\alpha$  secretion. **Conclusion** TNF- $\alpha$  influences the proliferation and secreting function of mouse embryonic fibroblasts through activating NF- $\kappa$ B pathway.

[**Key words**] tumor necrosis factor- $\alpha$ ; nuclear factor-kappaB; mouse embryonic fibroblasts; pyrrolidine dithiocarbamate

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5146). Corresponding author: Li Shirong, Tel: 86-23-68754192, E-mail: zhengxing@vip.163.com; Wu Julong, Tel: 86-23-68765350, E-mail: wj03310@tom.com

皮肤创面愈合后瘢痕的形成与增生,是当前整形外科研究的重点问题之一。皮肤创面愈合是一个多种细胞和细胞因子参与,涉及炎症反应、肉芽形成、血管生成和组织重塑等复杂病理生理过程。成纤维细胞是创面修复的关键细胞,此过程中创面的收缩、肉芽组织的形成、细胞外基质的沉积和重塑都需要成纤维细胞参与<sup>[1]</sup>,如果成纤维细胞功能与自身增殖紊乱,将会导致细胞外基质合成增多和过度沉积,形成增生性瘢痕,因此创面中成纤维细胞的功能状态将直接影响创面的愈合转归。

核转录因子  $\kappa$ B (nuclear factor-kappaB, NF- $\kappa$ B) 广泛参与细胞生长、凋亡和炎症反应,能够被许多不同的因素激活,包括炎症细胞因子(如 TNF- $\alpha$ 、IL-1)、氧化应激、细菌脂多糖、紫外辐射及病毒等<sup>[2]</sup>。肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 是体内诱导 NF- $\kappa$ B 活化的重要细胞因子,它可以诱导细胞产生促凋亡和抑制凋亡两种不同的信号效应,研究<sup>[3]</sup>提示其不同的生物学作用与细胞自身的特性和其作用浓度密切相关,但其机制尚未完全明了,同时该信号途径与皮肤创面修复过程有密切关系<sup>[4]</sup>,而这方面的研究报道并不多见。本研究探讨利用外源性 TNF- $\alpha$  作用于培养小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryo fibroblast, MEF),并结合使用 NF- $\kappa$ B 信号通路阻断剂吡咯烷二硫氨基甲酸 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC),观察阻断前后成纤维细胞增殖及分泌活动等变化,分析其可能的分子作用机制,以深入研究 TNF- $\alpha$  激活 NF- $\kappa$ B 信号通路对成纤维细胞生物学功能的影响,为探寻创面愈合及预防瘢痕形成提供新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器及试剂

倒置相差显微镜 (Olympus IX70)、荧光显微镜 (Leica)、电泳仪、酶标仪 (Bio-Rad)。MEF 细胞株由第三军医大学基础医学部遗传学教研室王燕副教授惠赠,重组小鼠 TNF- $\alpha$  购自美国 PeproTech 公司, PDTC 购自美国 Sigma 公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清、胰蛋白酶-EDTA 消化液、青链霉素购自美国 Gibco 公司。CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所公司; I $\kappa$ B $\alpha$  兔抗鼠一抗、I $\kappa$ B $\alpha$  Western blot 发光试剂盒、蛋白裂解液购自武汉博

士德公司; Alexa fluor594 驴抗兔 IgG 二抗购自 Invitrogen 公司、小鼠 SDF-1 $\alpha$  ELISA 试剂盒购自美国 RD 公司。

### 1.2 MEF 的培养

将 MEF 常规培养于含 10% 胎牛血清及 100 U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素的高糖 DMEM 培养液中,置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,每 3 天更换 1 次培养基,MEF 为贴壁细胞,融合度达到 70% ~ 80% 时用胰酶消化法传代。

### 1.3 实验分组及处理

实验分为 3 组:空白对照组、TNF- $\alpha$  组和 TNF- $\alpha$  + PDTC 组。取对数生长期 MEF 用于实验,当细胞生长融合度至约 70% 时,换用含有 0.2% 的胎牛血清的 DMEM 饥饿处理,12 h 后给以 TNF- $\alpha$  刺激。空白对照组为正常培养的 MEF,不做处理;TNF- $\alpha$  组加入 TNF- $\alpha$  进行刺激;TNF- $\alpha$  + PDTC 组在每次实验前样本先加入终浓度为 20  $\mu$ mol/L 的 PDTC 作用 0.5 h,而后加入 TNF- $\alpha$  刺激。

### 1.4 CCK-8 检测细胞增殖活性

按  $2 \times 10^3$  个/孔的密度将 MEF 接种于 2 块 96 孔培养板,等 24 h 贴壁后加入终浓度分别为 5、25、50、75、100 ng/ml 的 TNF- $\alpha$  各 10  $\mu$ l,对照组 (0 ng/ml) 不加药物,每组设 6 个复孔。将 96 孔培养板置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中分别培养 24、48 h 后取出,按照说明书每孔加入 CCK-8 检测试剂 10  $\mu$ l,选择 450 nm 波长,在 Bio-Rad 酶联免疫检测仪上测定各孔光密度值 (optical density, OD)。根据 OD 值计算细胞活力,值越大表明细胞增殖能力越强。

### 1.5 I $\kappa$ B $\alpha$ 免疫荧光

MEF 生长于盖玻片上,当细胞融合度达到 70% 时进行饥饿处理后给予 TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) 处理细胞 90 min。取出盖玻片用 PBS 洗涤后 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, PBS 充分洗涤,0.2% Triton X-100 + 5% 羊血清封闭处理 30 min。I $\kappa$ B $\alpha$  兔多克隆抗体 4  $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗涤 3 遍, Alexa fluor594 标记驴抗兔 IgG 二抗 37  $^{\circ}$ C 孵育 1h, 阴性对照用 PBS 代替一抗; PBS 洗涤后 DAPI 室温下复染细胞,加入荧光保护剂后封片于载玻片上。各实验组分别随机取 5 个视野,使用荧光显微镜采集图像,于 400 倍镜下观察, Image Pro Plus6.01 图像分析软件进行图像分析。以细胞质中出现红色颗粒为 I $\kappa$ B $\alpha$  表达阳性信号,以阳性信号强度即红染区累积光密度值 (integrated optical density, IOD) 为参数进行半定量测量。

### 1.6 Western blot 检测 I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白的表达

以 50 ng/ml 浓度的 TNF- $\alpha$  对贴壁的 MEF 进行刺激,依照不同时间点 (0.5、1、2、4、8 h) 收集各组细胞,提取各时间点细胞蛋白并定量。各组取蛋白 20  $\mu$ g,煮沸变性 5 min,行 SDS-聚

丙烯酰胺凝胶电泳,并以电转膜仪将蛋白转移至PVDF膜上;以5%脱脂奶粉于4℃下封闭,TBST洗涤,加一抗(1:500兔抗IκBα多抗,1:5000小鼠抗β-actin单抗)过夜,加入二抗(抗兔IgG-HRP,抗小鼠IgG-HRP)行免疫印迹检测,ECL试剂盒显色曝光,以β-actin为内参照。Quantity One软件扫描分析结果,用测得的目的条带的灰度×面积表示结果。

### 1.7 ELISA检测细胞分泌SDF-1α水平

MEF接种于6孔板内,融合率达60%时进行饥饿处理,12h后分别加入终浓度5、50 ng/ml的TNF-α进行刺激,继续培养24h后收集培养上清置于无菌管中,2000 r/min,离心20 min。仔细提取上清液后-80℃保存备用。按照ELISA试剂盒说明书进行操作,在酶标仪上测量各孔OD值,用Curve Expert软件根据标准曲线计算各组细胞中SDF-1α的表达量。

### 1.8 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用SPSS 17.0统计软件进行方差齐性检验、单因素方差分析、两样本均数比较 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 TNF-α对MEF增殖活性的影响

CCK-8方法检测结果显示,与对照组(0 ng/ml)比较,加入

TNF-α作用24h,TNF-α组除5 ng/ml和25 ng/ml浓度外,其余各浓度TNF-α刺激后,MEF的OD值均有明显增加,表明TNF-α促进了细胞增殖,统计分析有显著差异( $P < 0.05$ )。而在TNF-α+PDTC处理组,与同一时相点对应浓度TNF-α组比较,OD值均明显下调,有显著统计学差异( $P < 0.05$ )。此外在TNF-α+PDTC处理组,各浓度24、48h作用前后,OD值水平均呈现明显下降,有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

### 2.2 IκBα免疫荧光染色

细胞免疫荧光显示IκBα主要分布于细胞质内,细胞核浅染或不着色。通过荧光光度值分析,与对照组和TNF-α+PDTC组相比较,TNF-α处理后成纤维细胞细胞质内IκBα抗体免疫荧光呈现减弱(图1)。

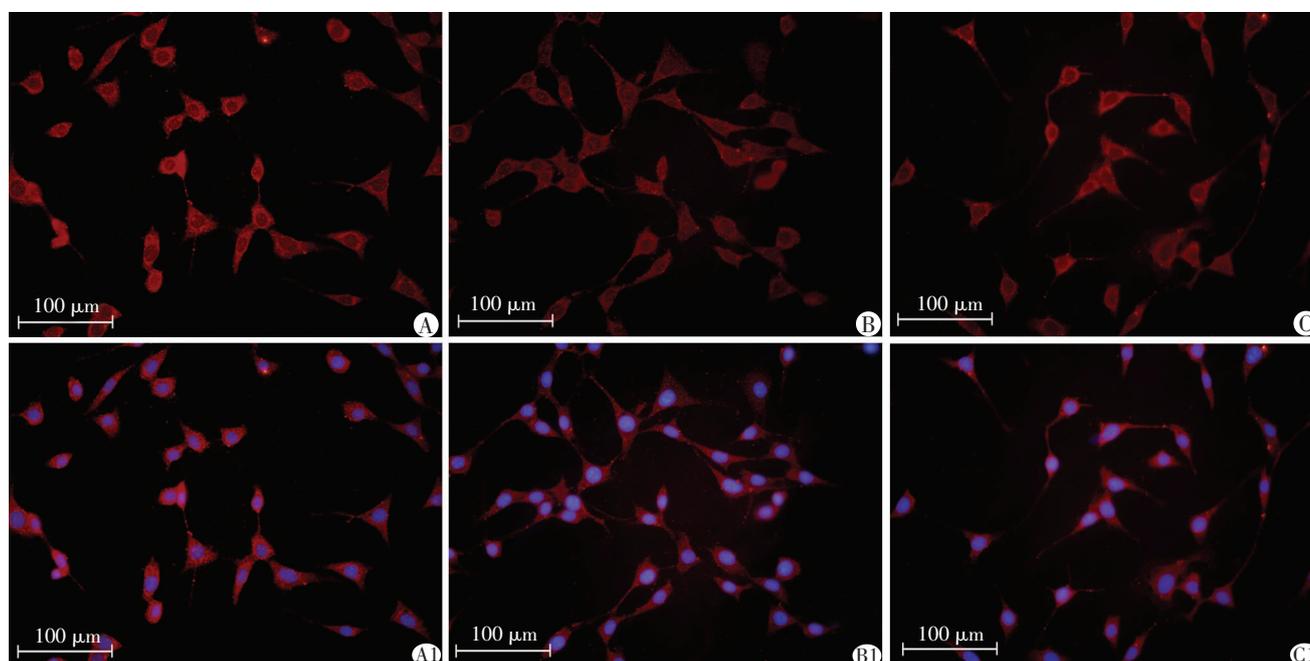
### 2.3 Western blot检测IκBα蛋白表达

终浓度50 ng/ml的TNF-α刺激成纤维细胞后,0.5h TNF-α组及TNF-α+PDTC组均出现IκBα蛋白表达水平明显降低,TNF-α组下降更加明显。随着TNF-α刺激时间的延长,IκBα蛋白表达水平逐渐恢复,到4h时基本接近正常。在TNF-α刺激的整个过程中,TNF-α组的IκBα蛋白表达水平均低于TNF-α+PDTC组,同一时相点比较,差异显著( $P < 0.05$ )。见图2,表2。

表1 不同浓度TNF-α对MEF增殖的影响[ $D(450), \bar{x} \pm s$ ]

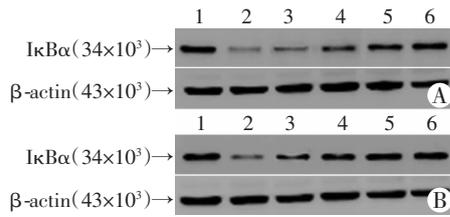
组别	TNF-α浓度(ng/ml)					
	0	5	25	50	75	100
TNF-α组						
24 h	0.60 ± 0.05	0.66 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.68 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.87 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.86 ± 0.10 <sup>ab</sup>
48 h	1.42 ± 0.09	1.45 ± 0.20 <sup>b</sup>	1.31 ± 0.05 <sup>ab</sup>	1.31 ± 0.08 <sup>ab</sup>	1.39 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.31 ± 0.12 <sup>ab</sup>
TNF-α+PDTC组						
24 h	0.60 ± 0.05	0.28 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.06 <sup>a</sup>
48 h	1.42 ± 0.09	0.57 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.07 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ ,与对照组(0 ng/ml)比较;b:  $P < 0.05$ ,与TNF-α+PDTC组比较



A: 对照组; B: TNF-α组; C: TNF-α+PDTC组; A1、B1、C1: 与DAPI重叠的图像

图1 IκBα免疫荧光染色(荧光显微镜)

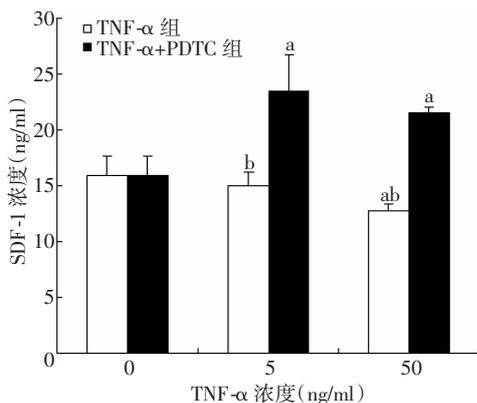
1~6: 分别为0、0.5、1、2、4、8 h; A: TNF- $\alpha$  组; B: TNF- $\alpha$  + PDTC 组图2 不同因素处理后成纤维细胞 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的表达表2 TNF- $\alpha$  刺激后 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平变化(灰度值,  $\bar{x} \pm s$ )

时间	TNF- $\alpha$ 组	TNF- $\alpha$ + PDTC 组
0	3 070.0 $\pm$ 39.0	3 212.2 $\pm$ 57.5
0.5 h	1 421.7 $\pm$ 75.3 <sup>a</sup>	1 468.2 $\pm$ 45.8 <sup>a</sup>
1 h	1 673.9 $\pm$ 79.5 <sup>ab</sup>	1 848.9 $\pm$ 96.2 <sup>a</sup>
2 h	2 245.6 $\pm$ 51.3 <sup>ab</sup>	2 624.5 $\pm$ 67.2 <sup>a</sup>
4 h	2 610.4 $\pm$ 26.9 <sup>ab</sup>	3 112.3 $\pm$ 89.7
8 h	3 057.8 $\pm$ 19.9	3 245.3 $\pm$ 71.9

a:  $P < 0.05$ , 与 0 ng/ml 组比较; b:  $P < 0.05$ , 与 TNF- $\alpha$  + PDTC 组比较

#### 2.4 ELISA 测定成纤维细胞分泌 SDF-1 $\alpha$ 水平

以不加入 TNF- $\alpha$  组(0 ng/ml)作对照,在给予浓度 5 ng/ml 和 50 ng/ml 的 TNF- $\alpha$  刺激后, TNF- $\alpha$  组成纤维细胞 SDF-1 $\alpha$  的分泌量呈逐渐减少趋势;而在 TNF- $\alpha$  + PDTC 处理组, SDF-1 $\alpha$  浓度则明显升高,与 TNF- $\alpha$  组比较有显著差异( $P < 0.05$ )。见图 3。

a:  $P < 0.05$ , 与 0 ng/ml 组比较; b:  $P < 0.05$ , 与 TNF- $\alpha$  + PDTC 组比较图3 TNF- $\alpha$  刺激前后成纤维细胞分泌 SDF-1 $\alpha$  水平变化

### 3 讨论

皮肤损伤后的愈合是一系列细胞如表皮细胞、成纤维细胞、内皮细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)以及多种生长因子、细胞因子和趋化因子共同参与的复杂过程<sup>[5]</sup>,上述成分间存在复杂的网络调控。其中成纤维细胞在创面愈合特别是瘢痕形成过程中起着核心的作用。较早研究<sup>[6]</sup>已证实在皮肤损伤前后 3 d,成纤维细胞即出现增殖分化,第 4 天迁移到伤口内合成并分泌大量 ECM 及生长因子,第 7 天成纤维细胞开始表现为收缩表型-肌成纤维细胞,导致创面收缩。其活化增殖及功能活动变化是创面愈合与

瘢痕形成的主要病理学基础之一。

TNF- $\alpha$  是参与急慢性炎症的一种重要细胞因子,常通过一些转录因子的介导发挥作用,其中 NF- $\kappa$ B 是受 TNF- $\alpha$  激活的主要转录因子之一<sup>[7]</sup>。NF- $\kappa$ B 作为调节免疫和炎症重要的核转录因子,正常情况下其两个亚单位 p65 和 p50 与  $\kappa$ B 抑制蛋白(I $\kappa$ B)结合,以非活性状态存在于细胞质中。在 TNF- $\alpha$  等细胞因子的作用下, NF- $\kappa$ B 亚单位与 I $\kappa$ B 解聚释放,再转移到核内和特定基因的启动子或增强子结合导致某些基因表达,因此,作为 NF- $\kappa$ B 内源性抑制剂, I $\kappa$ B 是调控 NF- $\kappa$ B 信号途径的关键因子<sup>[8]</sup>;此途径参与免疫、血管生成、抗肿瘤以及炎症反应有关的基因转录调控<sup>[9]</sup>。PDTC 是一种 NF- $\kappa$ B 信号通路阻断剂,能阻止 I $\kappa$ B 亚单位的降解,抑制 NF- $\kappa$ B 活化,同时也阻碍 NF- $\kappa$ B 向细胞核内的转移,从而阻断 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活<sup>[10]</sup>,在转录水平上抑制 IL-1、TNF- $\alpha$  等炎症细胞因子的产生<sup>[11]</sup>。本组实验结果显示,经 TNF- $\alpha$  刺激后,成纤维细胞的增殖能力发生浓度依赖的现象明显增强,说明一定浓度的 TNF- $\alpha$  通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路,促进了成纤维细胞的增殖能力,阻断该信号通路则成纤维细胞的增殖能力明显减弱。细胞免疫荧光与 Western blot 对 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达与定位的研究也进一步支持了这一结果。此外值得重视的是有研究发现过度及持续的 NF- $\kappa$ B 活化是有害的, NF- $\kappa$ B 的失调与慢性感染、癌症、炎症性疾病、自身免疫性疾病相关<sup>[12]</sup>。适度阻断调控 NF- $\kappa$ B 信号通路,减少炎症因子 TNF- $\alpha$  等的产生,是减轻炎症反应的有效策略<sup>[13]</sup>。

SDF-1 $\alpha$  是参与调节组织/器官损伤修复的关键趋化因子,它对炎症细胞及间质干细胞等具有强烈的趋化作用。研究<sup>[14]</sup>表明在创面愈合过程中,内皮细胞和成纤维细胞是分泌 SDF-1 $\alpha$  的主要细胞,成纤维细胞的增殖活力与 SDF-1 $\alpha$  的分泌量密切相关。Fedyk 等<sup>[15]</sup>在皮肤伤口愈合的研究中发现,炎症反应能够显著抑制成纤维细胞分泌 SDF-1 $\alpha$ ,炎症因子 TNF- $\alpha$  在此可能扮演了重要角色。本实验中 SDF-1 $\alpha$  酶联免疫检测结果支持了这一假设, TNF- $\alpha$  作用下成纤维细胞 SDF-1 $\alpha$  分泌呈现降低趋势,而阻断 NF- $\kappa$ B 信号则能促进 SDF-1 $\alpha$  分泌。因此可以推断,在创面愈合过程中,通过调节 NF- $\kappa$ B 信号通路,抑制 TNF- $\alpha$  的作用,对于控制创面炎症及其愈后有着重要意义。

综上,本实验研究结果显示,一定浓度范围的 TNF- $\alpha$  具有促进成纤维细胞增殖能力的作用,通过阻断 NF- $\kappa$ B 信号通路后, TNF- $\alpha$  的促增殖作用受到抑制;同时 TNF- $\alpha$  通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路,也影响着成纤维细胞 SDF-1 $\alpha$  分泌等功能性活动。TNF- $\alpha$  的作

用与其浓度有关,对其在体动态变化及其作用机制还需要深入的实验研究。

### 参考文献:

[1] Olaso E, Lin H C, Wang L H, *et al.* Impaired dermal wound healing in discoidin domain receptor 2-deficient mice associated with defective extracellular matrix remodeling[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2011, 4(1): 5.  
[2] Tay S, Hughey J J, Lee T K, *et al.* Single-cell NF-kappaB dynamics reveal digital activation and analogue information processing[J]. *Nature*, 2010, 466(7303): 267-271.  
[3] Aggarwal B B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(9): 745-756.  
[4] Ulvmar M H, Sur I, Memet S, *et al.* Timed NF-kappaB inhibition in skin reveals dual independent effects on development of HED/EDA and chronic inflammation[J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 129(11): 2584-2593.  
[5] Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko M S, *et al.* Growth factors and cytokines in wound healing[J]. *Wound Repair Regen*, 2008, 16(5): 585-601.  
[6] Clark R A. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair[J]. *Am J Med Sci*, 1993, 306(1): 42-48.  
[7] Hao S, Baltimore D. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(3): 281-288.

[8] Shih V F, Tsui R, Caldwell A, *et al.* A single NFkappaB system for both canonical and non-canonical signaling[J]. *Cell Res*, 2011, 21(1): 86-102.  
[9] Adli M, Merkhofer E, Cogswell P, *et al.* IKKalpha and IKKbeta each function to regulate NF-kappaB activation in the TNF-induced/canonical pathway[J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9428.  
[10] 杨春蓉, 张徽, 黄伟, 等. PDT联合紫杉醇降低MDA-MB-231细胞增殖侵袭能力[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(6): 576-579.  
[11] Gupta S, Young D, Sen S. Inhibition of NF-kappaB induces regression of cardiac hypertrophy, independent of blood pressure control, in spontaneously hypertensive rats[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(1): H20-H29.  
[12] Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(8): 715-723.  
[13] Wellen K E, Hotamisligil G S. Inflammation, stress, and diabetes[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(5): 1111-1119.  
[14] Toksoy A, Muller V, Gillitzer R, *et al.* Biphasic expression of stromal cell-derived factor-1 during human wound healing[J]. *Br J Dermatol*, 2007, 157(6): 1148-1154.  
[15] Fedyk E R, Jones D, Critchley H O, *et al.* Expression of stromal-derived factor-1 is decreased by IL-1 and TNF and in dermal wound healing[J]. *J Immunol*, 2001, 166(9): 5749-5754.

(收稿:2012-01-04;修回:2012-02-28)

(编辑 王小寒)

文章编号:1000-5404(2012)15-1513-01

## 个案与短篇

### 肝素诱导血小板减少综合征形成1例

刘彦春, 杨植 (067000 河北承德,承德医学院附属医院血管外科)

[关键词] 肝素;肝素诱导血小板减少综合征;下肢深静脉血栓形成

[中图分类号] R558.2 [文献标志码] B

#### 1 临床资料

患者,男性,51岁,因右下肢疼痛、肿胀伴有胸闷、憋气5d,以“右下肢深静脉血栓形成,肺栓塞”于2011年3月24日入院。查体体温:36.8℃,心率:100/min,脉搏:22/min,血压:150/100 mmHg。双肺呼吸音清,右肺呼吸音弱。右下肢中度肿胀,皮肤张力高,有压痛,左下肢未见异常。双腿周径比(左/右):膝上15 cm:52/53,膝下12 cm:34/37。血管超声示:右下肢股浅静脉、腓静脉、胫后静脉血栓形成。肺动脉CT血管造影(CTA)示:右肺动脉主干及双侧肺动脉多级分支内充盈缺损。血小板计数 $98.00 \times 10^9/L$ 。入院后给予低分子肝素钙400U,2次/d皮下注射。3月28日在局麻下行永久性下腔静脉滤器

置入+肺动脉置管溶栓术。溶栓导管置于右中肺动脉处,术后给予尿激酶30万U,2h泵入,2次/d;然后给予肝素4mg/h持续泵入,据APTT值调整肝素泵入速度。使APTT维持在正常值的1.5~2.5倍。2d后患者右下肢肿胀减轻,疼痛感消失,呼吸困难、胸闷等症状缓解。肺动脉造影显示右中肺动脉血栓部分溶解。遂调整溶栓导管至右下肺动脉继续溶栓治疗。置管后第5天肺动脉造影显示右肺动脉3支显影良好,未见明显血栓影,遂拔除溶栓导管,给予皮下注射低分子肝素钙400U,2次/d皮下注射。4月4日患者突发意识障碍,右侧肢体无自主活动,肌张力高,左侧肢体肌力正常。双下肢肿胀,双腿周径比(左/右):膝上15 cm:47/51,膝下12 cm:37/40。头颅CT及CTA示:左侧大脑中动脉血栓形成,左侧大脑半球大面积脑梗死。血管超声检查示:双侧颈动脉、颈内动脉血栓形成,下腔静脉血栓形成。化验血常规血小板最低降至 $28.00 \times 10^9/L$ ,给予降颅压、改善循环等治疗。经多方会诊,逐项排除了置管、心脏、血液等系统因素导致血栓形成,认为2次血栓来源为肝素诱导的血小板减少可能性大。遂停用低分子肝素,给予阿加曲

(下转1526页)