

⑤微创手术,可以避免开放手术带来的广泛创伤和术后组织粘连,减少对骨折端的血供破坏,利于骨折愈合;⑥操作简单,材料获取方便,治疗花费低。

类似本装置的生物力学研究,也有学者作了相关报道。Slad 等^[14]发现克氏针 K2 能显著增加指间关节稳定性,防止再次脱位。Kneser 等^[15]的研究结果表明该装置能增加近节指间关节间隙宽度,并能有效阻止指间关节进一步狭窄。同时该装置会增加屈曲近节指间关节所需力量,故术后指导功能锻炼时,应告知患者需更大力量才能屈曲患指。

综上所述,克氏针-橡皮筋可活动型外固定牵引架能够对近节指间关节骨折脱位起到稳定固定,利于术后手指功能锻炼及恢复,取得较好临床治疗效果。本装置结构简单,制作方便,成本低廉,操作创伤小,是一种简单、有效的治疗方法。

参考文献

- Ellis SJ, Cheng R. Treatment of proximal interphalangeal dorsal fracture-dislocation injuries with dynamic external fixation: a pins and rubber band system [J]. J Hand Surg Am, 2007, 32(8): 1242-1250.
- Maitland FW, Chaytor AH. Complications following dislocations of the proximal interphalangeal joint [J]. J Bone Joint Surg Am, 2013, 95(14): 1326-1332.
- Suzuki Y, Matsunaga T. The pins and rubbers traction system for treatment of comminuted intraarticular fractures and fracture-dislocations in the hand [J]. Journal of Hand Surgery, 1994, 19(1): 98-107.
- Seno N, Hashizume H. Fractures of the base of the middle phalanx of the finger, classification, management, and long-term results [J]. J Bone Joint Surg Br, 1997, 79(5): 758-763.
- 王澍寰. 手部肌腱损伤后的功能评定 [J]. 手外科杂志, 1990, 6(2): 71-73.
- Elfar J, Mann T. Fracture-dislocations of the proximal interphalangeal joint [J]. J Am Acad Orthop Surg, 2013, 21(2): 88-98.
- Williams CS. Proximal interphalangeal joint fracture dislocations: stable and unstable [J]. Hand Clinics, 2012, 28(3): 409-416.
- Henn CM, Lee SK. Dynamic external fixation for proximal interphalangeal fracture-dislocations [J]. Operative Techniques in Orthopaedics, 2012, 22(3): 142-150.
- Shah CM, Sommerkamp TG. Fracture dislocation of the finger joints [J]. Journal of Hand Surgery, 2014, 39(4): 792-802.
- Jupiter JB, Hastings H, Capo JT, et al. The treatment of complex fractures and fracture dislocations of the hand [J]. Egyptian Orthopaedic Journal, 2012, 47(5): 321-328.
- Khoury JS, Bloom JMP. Current trends in the management of proximal interphalangeal joint injuries of the hand [J]. Plastic and Reconstructive Surgery, 2013, 132(5): 1192-1204.
- Ruland RT, Hogan CJ. Use of dynamic distraction external fixation for unstable fracture-dislocations of the proximal interphalangeal joint [J]. Journal of Hand Surgery, 2008, 33(1): 19-25.
- Hamada Y, Hibino N. Staged external fixation for chronic fracture-dislocation of the proximal interphalangeal joint: outcomes of patients with a minimum 2-year follow-up [J]. Journal of Hand Surgery, 2012, 37(3): 434-439.
- Slade JF, Gutow AP. Can a distractor Wxator prevent dorsal subluxation of PiP fracture-dislocations? [J]. Orthop Trans, 1996, 19(3): 828-833.
- Kneser U, Goldberg E. Biomechanical and functional analysis of the pins and rubbers traction system for treatment of proximal interphalangeal joint fracture dislocations [J]. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery, 2009, 129(1): 29-37.

(收稿日期:2014-11-03)

(修回日期:2014-12-20)

母乳对 Caco-2 细胞缺氧复氧损伤模型 NF-κB p65 表达的影响

陆 玲 王宇军 冯伟伟 毕明远 阮为勇

摘要 目的 通过研究母乳对 Caco-2 细胞缺氧复氧损伤模型 NF-κB p65 表达的影响,以期探讨母乳对坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)的作用机制。**方法** 实验分为对照组和缺氧复氧损伤模型组,两组各有常规培养液组(MEM)、未加热乳清组(5% BM)和加热乳清组(5% BMb)。造模后向两组分别加入常规培养液、未加热乳清、加热乳清,继续培养 6 h 后分别用 RT-PCR 检测法和免疫荧光法检测各组细胞中 NF-κB p65 表达情况。**结果** RT-PCR 检测结果显示对照组

基金项目:江苏省中西医结合医院基金资助项目(RC1102)

作者单位:210023 南京中医药大学(陆玲);210028 南京,江苏省中西医结合医院儿科(王宇军、冯伟伟、毕明远、阮为勇)

通讯作者:阮为勇,电子信箱:wyruan@126.com

和模型组中,5% 乳清和5% 加热乳清均能抑制NF- κ B p65 mRNA的表达($P < 0.01$),模型组中5% 乳清抑制NF- κ B p65 mRNA表达的作用较5% 加热乳清更明显($P < 0.05$);免疫荧光结果显示,缺氧复氧损伤后Caco-2细胞质内的NF- κ B p65被激活进入细胞核表达,5% 乳清可以抑制NF- κ B p65入核表达,并且较加热乳清作用更明显。**结论** 新鲜母乳可通过抑制NF- κ B p65的表达防治小肠上皮细胞缺血再灌注损伤,其可能是母乳防治新生儿坏死性小肠结肠炎机制之一。

关键词 母乳 坏死性小肠结肠炎 Caco-2细胞 NF- κ B p65

中图分类号 文献标识码 A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.07.038

Impact of Breast Milk on the Expression of NF- κ B p65 in Caco-2 Cells Model with Hypoxia/Reoxygenation Injury. Lu Ling, Wang

Yujun, Feng Weiwei, et al. Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu 210023, China

Abstract Objective To study the mechanisms of breast milk in preventing necrotizing enterocolitis (NEC) through determining the impact of breast milk on the expression of NF- κ B p65 in Caco-2 cells model with hypoxia/reoxygenation injury. **Methods** The study had control groups and model groups. They were divided into three groups (MEM, 5% BM and 5% BMB). We added conventional culture fluid, 5% breast milk supernatant fluid and 5% breast milk supernatant fluid boiled into the three groups respectively after the model was built. All cells continually cultured six hours, then the expression of NF- κ B p65 in Caco-2 cells were detected with RT-PCR and immunofluorescence method. **Results** RT-PCR method showed that in control groups and model groups 5% breast milk supernatant fluid boiled or unboiled could inhibit the expression of NF- κ B p65 mRNA ($P < 0.01$). Compared with 5% breast milk supernatant fluid boiled, the inhibitory effect of 5% breast milk supernatant fluid was better in model groups ($P < 0.05$). Immunofluorescence method showed that the expression of NF- κ B p65 in the cytoplasm of Caco-2 cells with hypoxia/reoxygenation injury was activated into the nucleus, which could be inhibited by 5% breast milk supernatant fluid boiled or unboiled, and 5% breast milk supernatant fluid was better.

Conclusion Fresh breast milk can prevent intestinal epithelial cells from ischemia reperfusion injury by inhibiting the expression of NF- κ B p65, which may be one of the mechanisms of breast milk preventing NEC.

Key words Breast milk; Necrotizing enterocolitis; Caco-2 cells; NF- κ B p65

随着医疗水平的提高,早产儿和低出生体重儿存活率增加,新生儿坏死性小肠结肠炎(NEC)的发生率呈上升趋势。近几年来,国内外专家对NEC进行了深入的研究,但NEC的病理机制尚未完全明确,缺乏有效的治疗药物,母乳喂养是目前唯一被证实有效的预防措施^[1-3]。Meinzen等^[4]研究证实,母乳喂养降低了超低出生体重儿生后两周NEC的发生率和病死率。尽管专家们已经证实了母乳对NEC的防治作用,但尚未阐明相关的作用机制^[5]。既往研究结果显示,NEC发病与肠上皮细胞缺氧复氧损伤密切相关。因此,本实验旨在通过建立Caco-2细胞缺氧复氧损伤模型,研究Caco-2细胞NF- κ B p65表达及母乳对Caco-2细胞缺氧、复氧损伤的防治作用,以探讨NEC的病理机制和母乳对NEC的防治作用机制。

材料与方法

1. 实验材料:(1) 细胞与主要试剂:Caco-2细胞株(中科院上海细胞库);母乳(2012年6月~2013年6月江苏省中西医结合医院产科正常分娩产妇);人外周血红细胞裂解液(中国深圳晶美生物工程有限公司);核因子NF- κ B p65抗体(美国CST公司);反转录试剂盒(美国MBI Fermentas公司);PCR引物(中国上海生物工程技术服务有限公司)。(2) 主要仪器设备:7500荧光定量PCR仪(美国ABI公司);CentroX3超灵敏微孔板发光检测仪(德国Berthold公司);311/3141细

胞培养箱(美国Thermo Fisher公司),d-63450生物安全柜(德国Heal Force公司);ND-1000核酸蛋白测定仪(美国Nano Drop公司);ELx 808酶标仪(美国Bio-Tek公司);IX51倒置显微镜(日本Olympus公司)。

2. 实验方法:(1) Caco-2细胞培养:Caco-2细胞置于75cm²培养瓶中,采用DMEM培养基,包含10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、1% 谷氨酰胺和青霉素-链霉素双抗液,在37℃、5% CO₂和90% 相对湿度的环境中培养。每5天按1:3的比例传代,6~7天基本达到融合。(2) Caco-2细胞缺氧复氧损伤模型的建立^[6]:传代后第6天生长达到融合的Caco-2细胞,吸去90% 的培养液,以减少气体弥散距离,剩余培养液能维持细胞存活。将其置入密闭容器中,负压抽吸其中空气,换入高纯氮气,密闭后置入培养箱中孵育90min(缺氧),再取出,加培养液至原量,置入培养箱中孵育30min(复氧)。对照组细胞直接置培养箱中孵育。培养条件均为37℃、5% CO₂和90% 相对湿度。(3) 母乳上清液的提取:产妇生后2~4天的母乳存于4℃冰箱,在24h内处理,12000r/min离心10min去除脂肪成分和细胞碎片,配制成5% 的乳清用于实验;母乳煮沸5分钟,12000r/min离心10min后配制成5% 乳清,两组乳清均存于-20℃冰箱备用。(4) 实验分组:实验分为对照组和缺氧复氧损伤模型组,两组各有常规培养液组(MEM)、未加热乳清组(5% BM)和加热乳清组(5% BMB)。造模后向两组分别加入常规培养液、未加热乳清、加热乳清,继续培养6h后分别用RT-PCR检测法和免疫荧光法检测各组细胞中NF-

-κB p65 表达情况。(5) RT - PCR 检测法:根据试剂盒说明书操作,PCR 引物:GAPDH 引物上游引物:5' - ACCACAGTC-CATGCCATCAC - 3',下游引物:5' - TCCACCACCTGTTGCT-GTA - 3',NF - κB p65 引物上游引物:5' - AGGCTCCTGT-GCGTGTCTCC - 3',下游引物:5' - GGGTGGGCTTGGGGCAG-GT - 3'。(6) 免疫荧光法:对数期生长的细胞接种在 24 孔培养板,每孔密度达到 70% ~ 80%。用 4% 冰多聚甲醛固定细胞 20min,PBS 洗 15min,0.1% Triton X - 100 室温 10min。PBS 洗后,用 3% BSA 封闭 1h,然后一抗 4℃ 孵育过夜,随后用 Texas Red 标记二抗室温孵育 1h。DAPI 染色后封片,荧光显微镜下观察并拍照。

3. 统计学方法:所有实验重复 3 次,采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. RT - PCR 检测 Caco - 2 细胞 NF - κB p65 mRNA 的相对表达:RT - PCR 检测结果显示:模型 MEM 组 NF - κB p65 mRNA 的相对表达明显高于对照 MEM 组,且差异有统计学意义 ($P < 0.01$),提示缺氧复氧处理后 NF - κB p65 mRNA 高度表达;模型组内 5% BM 组、5% BMb 组分别与 MEM 组比较 NF - κB p65 mRNA 表达量明显降低,对照组内 5% BM 组、5% BMb 组分别与 MEM 组比较 NF - κB p65 mRNA 表达量明显降低,且差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),提示对照组和模型组中,5% 乳清和 5% 加热乳清均能下调 NF - κB p65 mRNA 的表达,说明 Caco - 2 细胞缺氧复氧损伤前后 5% 乳清和 5% 加热乳清都能下调 NF - κB p65 mRNA 表达;模

型组内 5% BM 组 NF - κB p65 mRNA 的相对表达低于 5% BMb 组,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$),对照组内 5% BM 组 NF - κB p65 mRNA 的相对表达与 5% BMb 组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),提示 Caco - 2 细胞缺氧复氧损伤后 5% 乳清下调 NF - κB p65 mRNA 表达的作用较 5% 加热乳清更明显(表 1)。

表 1 Caco - 2 细胞 NF - κB p65 mRNA 的相对表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	NF - κB p65 mRNA 的相对表达	
	MEM	5% BM
对照组	MEM	1.00 ± 0.10
	5% BM	0.48 ± 0.05 *
	5% BMb	0.45 ± 0.08 *
模型组	MEM	2.12 ± 0.22 *
	5% BM	0.63 ± 0.07 #▲
	5% BMb	0.97 ± 0.25 #

与对照 MEM 组比较, * $P < 0.01$; 与模型 MEM 组比较, # $P < 0.01$; 与模型 5% BMb 组比较, ▲ $P < 0.05$

2. 免疫荧光法检测 Caco - 2 细胞中 NF - κB p65 表达:对照组 Caco - 2 细胞核内几乎无红色荧光,缺氧复氧模型组 Caco - 2 细胞核内均有红色荧光, MEM 组最明显,5% BM 最少,说明缺氧复氧刺激后 Caco - 2 细胞质内的 NF - κB p65 被激活进入细胞核表达,5% 乳清可以抑制 NF - κB p65 入核表达,并且较加热乳清作用更明显,这与 RT - PCR 检测结果相符(图 1)。

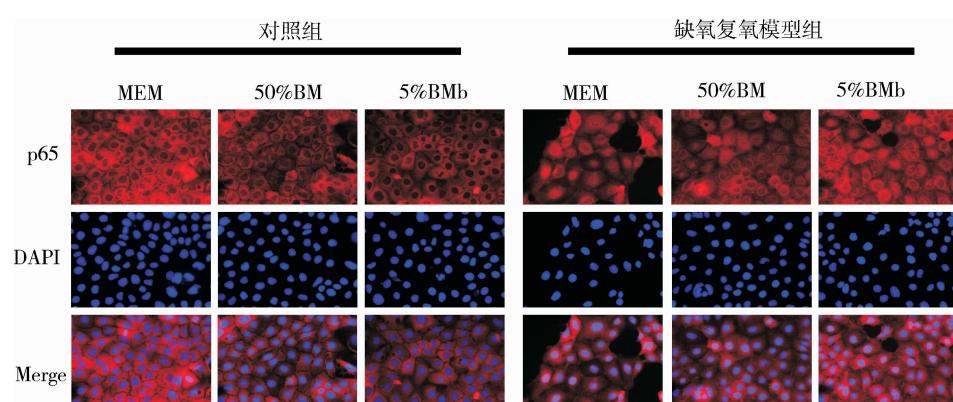


图 1 免疫荧光法检测 Caco - 2 细胞中 NF - κB p65 表达情况

NF - κB p65 染色为红色荧光,细胞核的 DAPI 染色为蓝色荧光;通过判断 NF - κB p65 是否入核,可知 NF - κB 是否被激活;对照组细胞核内几乎无红色荧光;缺氧复氧模型组细胞核内均有红色荧光, MEM 组最明显,5% BM 最少

化道急症,目前缺乏有效的治疗药物,母乳喂养被众多专家证实为一种有效的防治手段^[7,8]。新鲜母乳

讨 论

新生儿坏死性小肠结肠炎是 NICU 中常见的消

中含有多种免疫保护因子和生物活性物质,如免疫球蛋白、乳铁蛋白、表皮生长因子、转化生长因子、抗氧化酶、巨噬细胞、淋巴细胞、双歧因子等,能有效增加早产儿尚未发育成熟的胃肠道的免疫防御能力,促进肠道黏膜屏障的建立^[8]。

NEC 主要表现为肠黏膜的损伤,既往研究显示,NEC 发病与肠上皮细胞缺氧复氧损伤密切相关。Caco - 2 细胞源于人体结肠腺癌细胞,生长达到融合后有柱状凸起,向培养液一侧形成刷状缘,类似于小肠微绒毛,且含有与上皮细胞相关的酶系,其结构和功能类似于分化的小肠上皮细胞,能很好的模拟肠道吸收过程,目前已被广泛用于肠道相关疾病的体外研究以及药物吸收研究。本研究运用 Caco - 2 细胞缺氧复氧损伤模拟缺氧致 NEC 病理过程,探讨母乳对 NEC 的作用机制。

NF - κB 信号通路是炎症研究的热点,通常情况下 NF - κB 以二聚体的形式存在,最普遍的二聚体是 p65/p50,其与抑制性蛋白 IκB 结合,以无活性的形式存在于细胞质中^[9]。当受到某些因素刺激,IκB 磷酸化后迅速降解,NF - κB 二聚体得到释放,p65 激活后进入细胞核中,促进炎性因子的表达^[10,11]。前期实验研究发现缺氧、复氧损伤后 Caco - 2 细胞中炎性因子 IL - 1β、IL - 6、TNF - α 均明显表达,母乳能抑制这些炎性因子的表达,其可能是通过抑制 NF - κB p65 的表达来实现。

本研究运用 RT - PCR 和免疫荧光检测 Caco - 2 细胞中 NF - κB p65 的表达情况,RT - PCR 结果显示,Caco - 2 细胞缺氧、复氧损伤前后 5% 乳清均能起下调 NF - κB p65 mRNA 表达的作用,Caco - 2 细胞缺氧复氧损伤后 5% 乳清下调 NF - κB p65 mRNA 表达的作用较 5% 加热乳清更明显;免疫荧光法显示缺氧复氧刺激后 Caco - 2 细胞质内的 NF - κB p65 被激活进入细胞核表达,5% 乳清可以抑制 NF - κB p65 入核表达,并且较加热乳清作用更明显,这与 RT - PCR 检测结果相符,进一步说明母乳能够抑制 NF - κB p65 的表达,这可能是其防治 NEC 的一个机制。欧洲儿科胃肠病、肝病和营养学协会 (ESPGHAN) 颁布的文件指出,新鲜的生母母乳是早产儿的第一选择^[12]。本实验用加热乳清做对照,证实新鲜母乳中

的有效成分在加热后受影响或者部分受影响,因此新鲜母乳防治 NEC 的作用更明显。

综上所述,本研究显示母乳可通过抑制 NF - κB p65 的表达减轻缺氧复氧 Caco - 2 细胞的损伤,尤其是新鲜母乳作用更明显,为母乳防治 NEC 提供一定的理论依据。因为母乳成分十分复杂,其对 NEC 可能存在多重作用机制,需要进一步研究。

参考文献

- Hans VG, 陈超, 张蓉. 新生儿坏死性小肠结肠炎的热点问题 [J]. 中国循证儿科杂志, 2011, 6(5): 321 - 323
- 张向荣, 封志纯, 王瑞娟. 新生儿坏死性小肠结肠炎信号通路研究进展 [J]. 中国新生儿科杂志, 2014, 29(3): 209 - 211
- Schnabl KL, Van Aerde JE, Thomson AB, et al. Necrotizing enterocolitis: a multifactorial disease with no cure [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(14): 2142 - 2161
- Meinzen DJ, Poindexter B, Wrage L, et al. Role of human milk in extremely low birth weight infants' risk of necrotizing enterocolitis or death [J]. J Perinatol, 2009, 29(1): 57 - 62
- Evelyn JK, Monica Z, Caroline N, et al. The human milk oligosaccharide disialyllacto - N - tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats [J]. Gut, 2012, 61(10): 1417 - 1425
- 赵小辰, 王广基, 孙炳伟, 等. Caco - 2 细胞缺氧复氧损伤后二肽载体表达及生物学功能的改变 [J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(1): 74 - 77
- Gane B, Bhat BV, Adhisivam B, et al. Risk factors and outcome in neonatal necrotising enterocolitis. [J] Indian J Pediatr, 2014, 81(5): 425 - 428
- Gregory KE, Walker WA. Immunologic factors in human milk and disease prevention in the preterm infant [J]. Curr Pediatr Rep, 2013, 1(4): 222 - 228
- 瞿慧, 杨毅宁, 马依彤, 等. 氧化型低密度脂蛋白对 NF - κB 信号通路的作用 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(12): 1254 - 1257
- Tang T, Zhang J, Yin J, et al. Uncoupling of inflammation and insulin resistance by NF - kappaB in transgenic mice through elevated energy expenditure [J]. J Biol Chem, 2010, 285(7): 4637 - 4644
- Gupta SC, Singh R, Pochampally R, et al. Acidosis promotes invasiveness of breast cancer cells through ROS - AKT - NF - κB pathway [J]. Oncotarget, 2014, 5(23): 12070 - 12082
- ESPGHAN Committee on Nutrition, Arslanoglu S, Corpeleijn W, et al. Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2013, 57(4): 535 - 542

(收稿日期:2014 - 12 - 12)

(修回日期:2015 - 01 - 07)