

# 重组胸腺素 $\beta 4$ 调节 NF- $\kappa$ B 表达促进兔角膜碱烧伤后修复

龙安华<sup>1</sup>, 李明<sup>1</sup>, 王晓坤<sup>1</sup>, 司文<sup>1</sup>, 李玄德<sup>1</sup>, 聂李亚<sup>2</sup>, 马素永<sup>2</sup>, 车永哲<sup>1</sup>, 许松山<sup>2</sup>

基金项目: 中国南开大学百项工程立项资助项目(No. BX6-248)  
作者单位:<sup>1</sup>(300071) 中国天津市, 天津南开大学医学院生物活性材料教育部重点实验室;<sup>2</sup>(100085) 中国北京市, 北京诺思兰德生物技术股份有限公司  
作者简介: 龙安华, 在读硕士研究生。  
通讯作者: 车永哲, 副教授, 研究方向: 脑缺血、心肌缺血修复机制. cheli@nankai.edu.cn  
收稿日期: 2010-03-08 修回日期: 2010-04-09

## Recombinant Thymosin $\beta 4$ regulate corneal nuclear factor $\kappa$ B expression after rabbit corneal alkali injury

An-Hua Long<sup>1</sup>, Ming Li<sup>1</sup>, Xiao-Kun Wang<sup>1</sup>, Wen Si<sup>1</sup>, Xuan-De Li<sup>1</sup>, Li-Ya Nie<sup>2</sup>, Su-Yong Ma<sup>2</sup>, Yong-Zhe Che<sup>1</sup>, Song-Shan Xu<sup>2</sup>

**Foundation item:** Nankai University 100 Project Foundation (No. BX6-248)

<sup>1</sup>Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, Medical College of Nankai University, Tianjin 300071, China;  
<sup>2</sup>Beijing Nuosilande Biotechnology Co., Ltd. Beijing 100085, China

**Correspondence to:** Yong-Zhe Che. Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, Medical College of Nankai University, Tianjin 300071, China. cheli@nankai.edu.cn  
Received: 2010-03-08 Accepted: 2010-04-09

### Abstract

• **AIM:** To investigate the ability of Thymosin  $\beta 4$  (T $\beta 4$ ) to promote healing in an alkali injury model *in vivo* and the mechanisms involved in that process which T $\beta 4$  may be a potential anti-inflammation agent in this model.

• **METHODS:** Corneas of the New-Zealand Rabbit were chemically burned with a 6mm disc soaked in 1mol/L NaOH for 30 seconds. Eyes were irrigated copiously with saline and then treated topically with PBS (Negative control group), rh-EGF (jinyinshu drop, Positive control group), and T $\beta 4$  (0.1, 1, 10 $\mu$ g/50 $\mu$ L) twice daily. At the time point of 1 day, 3, 7, 14 days postburn, the healing rate of the cornea were examined and MMP-2, TIMP-2, VEGF immunostaining performed.

• **RESULTS:** T $\beta 4$ -treated corneas demonstrated improved cornea healing rate of 33.8% vs PBS-treated corneas of 22.8% ( $P < 0.01$ ), 1 $\mu$ g/50 $\mu$ L T $\beta 4$  seemed to be the best dosage. Whereas immunohistochemistry result suggested that T $\beta 4$  decreased corneal NF- $\kappa$ B expression ( $P < 0.01$ ) after alkali injury, no change in IL (interleukin) -1 $\beta$  was detected ( $P > 0.05$ ). The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) result suggested that there's a significant

decrease to the NF- $\kappa$ B protein levels ( $P < 0.01$ ).

• **CONCLUSION:** T $\beta 4$  treatment decreases corneal inflammation and inhibits the expression of NF- $\kappa$ B to improve cornea healing. The result have important clinical implications for the potential role of T $\beta 4$  as a corneal anti-inflammatory agent.

• **KEYWORDS:** alkali injury; wound healing; Thymosin beta4; nuclear factor-kappa B; interleukin-1 $\beta$

Long AH, Li M, Wang XK, et al. Recombinant Thymosin  $\beta 4$  regulate corneal nuclear factor  $\kappa$ B expression after rabbit corneal alkali injury. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(5): 844-846

### 摘要

**目的:** 探讨重组胸腺素  $\beta 4$  (Thymosin  $\beta 4$ , T $\beta 4$ ) 对角膜碱烧伤后角膜核转录因子  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 表达的影响和促进角膜愈合的观察。

**方法:** 用 1mol/L NaOH 浸透的 6mm 直径圆滤纸片贴于兔角膜中央 30s, 建立兔角膜碱烧伤模型。动物随机分为实验组和对照组, 实验组给予低中高剂量 (0.1, 1, 10 $\mu$ g/50 $\mu$ L) T $\beta 4$ , 对照组给予 PBS (阴性对照组) 和 rh-EGF (阳性对照组) 皆 2 次/d 滴眼。烧伤后 1, 3, 7, 14d 肉眼观察角膜烧伤面积的变化, 照相、统计愈合率; 免疫组化染色检测 NF- $\kappa$ B 和 IL-1 $\beta$  表达; 取烧伤区角膜组织匀浆液提取细胞核蛋白, 用 ELISA 检测 NF- $\kappa$ B 的 p65 亚基表达水平。

**结果:** 角膜碱烧伤后 T $\beta 4$  用药组角膜愈合率最高达到 33.8%, 相应阴性对照组为 22.8%, T $\beta 4$  用药组显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 其中中剂量 T $\beta 4$  组愈合率高于其他剂量组; T $\beta 4$  用药组 NF- $\kappa$ B 免疫组化染色积分吸光度明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ), ELISA 检测 NF- $\kappa$ B 的 p65 亚基, 在 T $\beta 4$  用药组中表达最少 ( $P < 0.01$ ), IL-1 $\beta$  免疫组化染色阳性, 但实验组和对照组差异无统计学意义。

**结论:** 重组 T $\beta 4$  促进角膜碱烧伤修复, 其机制可能与下调 NF- $\kappa$ B 在细胞核内的表达相关。

**关键词:** 碱烧伤; 创伤愈合; 胸腺素  $\beta 4$ ; 基质金属蛋白酶-2; 血管内皮生长因子

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.05.007

龙安华, 李明, 王晓坤, 等. 重组胸腺素  $\beta 4$  调节 NF- $\kappa$ B 表达促进兔角膜碱烧伤后修复. 国际眼科杂志 2010;10(5): 844-846

### 0 引言

角膜碱烧伤是一种严重的角膜损伤。研究显示, 角膜碱烧伤后许多促炎因子和细胞趋化因子表达增加<sup>[1]</sup>, 这些促炎因子表达的增加导致角膜损伤部位白细胞和单核细胞浸润, 组织破坏和溶解作用会导致角膜愈合的延迟。TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  是非常重要的调节炎症程度的细胞因子,

它们在感染、组织损伤、恶性肿瘤和细胞凋亡等过程中通过启动炎症反应来抵抗外来物入侵<sup>[2]</sup>,但失控的炎症反应往往导致组织自身损伤,不利于组织愈合<sup>[3]</sup>。T $\beta$ 4 是 G-肌动蛋白偶联蛋白,最近研究表明 T $\beta$ 4 能够调节肌动蛋白平衡,促进多种细胞迁移<sup>[4,5]</sup>,抑制炎症过度表达<sup>[6]</sup>,抑制细胞凋亡<sup>[7]</sup>等;在促进皮肤创伤愈合<sup>[8]</sup>,保护和修复心肌,促进角膜碱烧伤后修复<sup>[9]</sup>以及促进毛囊干细胞生长等方面具有很好的促进和调节作用。近年来研究显示 T $\beta$ 4 和其变异体 Sulfoxide T $\beta$ 4, splice-variant T $\beta$ 4 均有抑制炎症因子和促进组织创伤愈合的作用<sup>[10,11]</sup>。T $\beta$ 4 在大鼠角膜清创术后能调节 IL-1 和 IL-8 表达并促进角膜再上皮化和角膜愈合,促炎因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  可以激活 NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B 是 Rel 家族的同源蛋白,最重要的两个亚基是 p65 和 p50,被激活后以二聚体形式转位至细胞核内发挥转录因子活性,与细胞炎症过程密切相关。在角膜碱烧伤中 NF- $\kappa$ B 的抑制剂 SN50 能加速角膜上皮细胞增殖促进角膜愈合<sup>[12]</sup>, Sosne 等<sup>[6]</sup>首次报道 T $\beta$ 4 具有对 NF- $\kappa$ B 的抑制作用,可以调节角膜碱烧伤后炎症反应的程度,是 T $\beta$ 4 促角膜修复的可能机制。我们观察 T $\beta$ 4 促进角膜碱烧伤后角膜愈合的情况下,并探讨 T $\beta$ 4 是否通过调节 NF- $\kappa$ B 的机制发挥其抗炎作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康成年新西兰白兔(军事医学科学院实验动物中心提供),2.0~3.0kg,雌雄不限。60 只动物随机分为实验组和对照组,实验组又分低剂量(0.1 $\mu$ g)、中剂量(1 $\mu$ g)、高剂量(10 $\mu$ g)组,对照组分为 PBS 阴性对照组和 rh-EGF 阳性对照组,每组 12 只,分别在 1,3,7,14d 各处死 3 只,快速取材完整兔角膜。重组 T $\beta$ 4 由北京诺思兰德生物技术公司提供, rh-EGF 滴眼液商品名为“金因舒”,由深圳市华生元基因工程发展有限公司生产(国药准字 S20040006),抗兔 IL-1 $\beta$  一抗由武汉博士德生物工程有限公司提供,抗兔 NF- $\kappa$ B 一抗由 santa cruz Biotechnology, Inc 提供,过氧化物酶和二抗等免疫组化试剂以及 ELISA 试剂盒均由天津灏洋生物制品科技有限公司提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 兔角膜碱烧伤模型制作** 实验动物用 20g/L 利多卡因 2mL 局部浸润麻醉,自制开睑器开睑,用在 40g/L NaOH 浸透的直径为 6 mm 的圆滤纸片贴于两眼角膜中央,30s 后迅速用无菌生理盐水冲洗 5min,建立角膜碱烧伤模型。每天分别用 3 种剂量的 T $\beta$ 4、无菌 PBS 和 rh-EGF 滴眼液早晚两次滴眼。分别在 1,3,7,14d 取材,部分组织迅速固定于 40g/L 多聚甲醛固定液 24h,经常规石蜡包埋,行水平连续切片(5 $\mu$ m),部分组织迅速冷冻备用。

**1.2.2 角膜愈合率检测** 对 14d 取材的实验动物,角膜碱烧伤后每隔 1d 拍照角膜烧伤部位, Motic 3.0 计算角膜愈合率,角膜愈合率 = (1-取材时角膜损伤面积/原始角膜损伤面积)  $\times$  100%。

**1.2.3 NF- $\kappa$ B 和 IL-1 $\beta$  表达的检测** 每个角膜标本取 1 张切片行 HE 染色,观察组织学形态。再各取 1 张行 NF- $\kappa$ B 和 IL-1 $\beta$  免疫组化染色,一抗(1:50)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,相应的生物素标记的二抗(1:200)室温 45min, SP 复合物室温孵育 45 min, DAB 显色,显微镜下控制并严格控制各组的反应时间, Mayer 苏木精对比染色 1min,常规封片。显微镜(Leica DM RXA2)观察并取角膜中央和角膜缘各 3 张图片,用于图像分析。

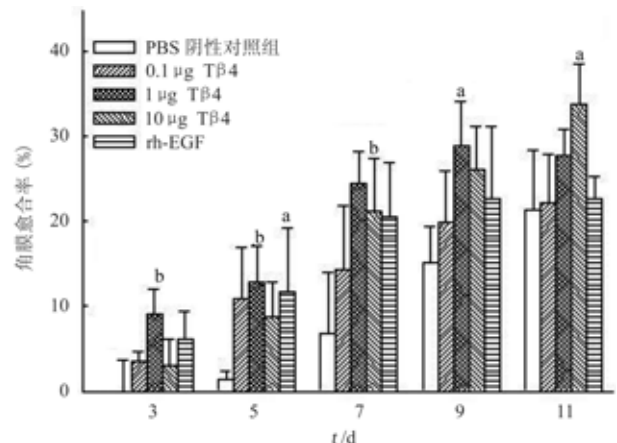


图 1 角膜碱烧伤后角膜愈合率 <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs PBS 阴性对照组。

**1.2.4 细胞核内 NF- $\kappa$ B 蛋白水平的检测** 在各时间点取角膜组织后立即冷冻于-70 $^{\circ}$ C,液氮冷冻条件下研磨组织,再分别用自配胞质裂解液和胞核裂解液抽提胞质蛋白和胞核蛋白,胞核蛋白用于 ELISA 检测 NF- $\kappa$ B 蛋白的 p65 亚基表达情况,操作均按试剂盒说明步骤进行。

统计学分析:对免疫组化染色的切片每组动物各取 5 张,显微镜照相取图时按照两角膜缘和损伤中央部位各取 3 张图,用 Motic 3.0 图像分析软件分析平均积分吸光度(IOD/Area),行两因素方差分析(Two way ANOVA)和 Dunnett-t 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 烧伤愈合率** 碱烧伤后 11d 时阴性对照和阳性对照组角膜愈合率分别为 22.7% 和 21.4%, T $\beta$ 4 用药组愈合率分别为 22.2%、27.7% 和 33.8%,明显高于 PBS 阴性对照组( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); T $\beta$ 4 三个剂量组中中剂量组在 3,5,7 和 9d 时间点均高于其它剂量组,但差异无统计学意义(图 1)。

**2.2 NF- $\kappa$ B 和 IL-1 $\beta$  的表达** 在烧伤后 1 和 3d 角膜上皮、内皮细胞胞质均为阳性,均匀分布,阳性部位以上皮细胞基底膜层和角膜边缘上皮最为明显,经平均积分光密度分析, T $\beta$ 4 用药组和对照组阳性强度无统计学差异;7d 各组染色仍为阳性,但 T $\beta$ 4 用药组染色强度比对照组低( $P < 0.05$ );14d T $\beta$ 4 用药组明显阳性部位比对照组少,染色强度低( $P < 0.01$ )。各时间点 rh-EGF 阳性对照组与 PBS 阴性对照组无差异( $P > 0.05$ )。IL-1 $\beta$  免疫组化染色结果,靠近基底膜的角膜上皮、内皮层细胞胞质均有强阳性表达,基质层有散在表达的颗粒,但免疫阳性表达弱。平均积分光密度分析,在各个时间点, T $\beta$ 4 用药组和对照组阳性强度无统计学差异。

**2.3 细胞核内 NF- $\kappa$ B 水平** ELISA 检测角膜细胞核 NF- $\kappa$ B p65 亚基蛋白表达结果如图 2,在 1d rh-EGF 阳性对照组和阴性对照组、T $\beta$ 4 各剂量组之间表达量无差异( $P > 0.05$ );3d NF- $\kappa$ B 在 T $\beta$ 4 用药组中表达显著降低( $P < 0.01$ ),而对照组 NF- $\kappa$ B 表达跟 1d 相比无变化;7d 和 14d T $\beta$ 4 用药组比对照组表达低( $P < 0.01$ )。但 T $\beta$ 4 各剂量组之间差异没有规律。ELISA 检测细胞核内 NF- $\kappa$ B p65 亚基蛋白表达情况与免疫组化结果大致类似,但 ELISA 结果中 NF- $\kappa$ B 表达下降时间点比免疫组化提前至 3d。

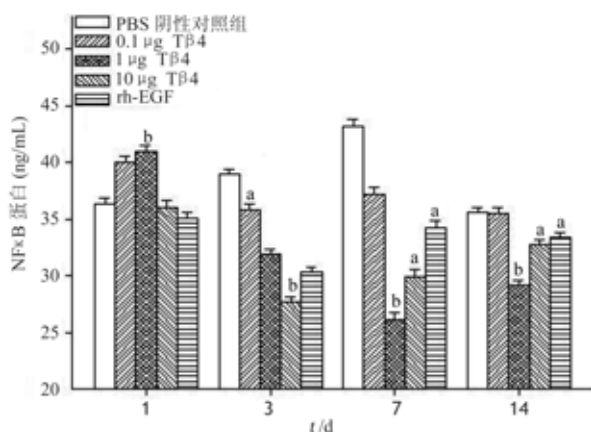


图2 角膜碱烧伤后细胞核内 NF-κB p65 表达量<sup>a</sup>  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>  $P < 0.01$  vs PBS 阴性对照组。

### 3 讨论

Tβ4 最初被认为是一种 G-肌动蛋白偶联蛋白,能与 G-肌动蛋白单体结合阻断 F-肌动蛋白形成,调节细胞肌动蛋白骨架的动态变化,与细胞运动等功能密切相关<sup>[13]</sup>。早在 1999 年 Yong 等<sup>[11]</sup>发现 Tβ4 硫氧化物 (thymosin sulfoxide) 在体内体外均有很好的抗炎作用,能抑制中性粒细胞的趋化作用,减少炎症介质释放等。Badamchian 等发现 Tβ4 能降低大剂量内毒素对大鼠的致死率,减少血液中 IL-1, PFG 等多种炎症因子的含量,提示 Tβ4 具有抗内毒素休克作用<sup>[14]</sup>。Sosne 等用不同的动物模型证实 Tβ4 具有抗炎促进角膜损伤修复的作用。我们的实验结果证实 Tβ4 可加速角膜碱烧伤后愈合,组织学观察显示角膜再上皮化明显,角膜各层组织结构清晰,减少角膜内炎症细胞浸润。

角膜碱烧伤后启动一系列的炎症进程,释放大量的趋化因子诱导中性粒细胞、巨噬细胞等进入损伤区域,并且许多前炎症因子如 TNF-α, IL-1β 等释放增加,使损伤局部炎症失调,这是角膜碱烧伤后组织破坏严重难以愈合的原因之一。Sosne 等研究 Tβ4 可以降低角膜碱烧伤后 MIP 和 MCP, KC 等趋化因子表达,减少 PMN 浸润,减轻修复过程中过度的炎症反应,促进角膜愈合<sup>[3]</sup>。TNF-α 和 IL-1β 等前炎症因子能激活多种信号通路而在调节组织炎症过程中起关键作用<sup>[2]</sup>。NF-κB 是 TNF-α 和 IL-1β 等激活的重要的转录因子,调节许多炎症相关细胞因子的转录表达。早期研究使用 NF-κB 特异性抑制剂能减轻组织炎症损伤,促进角膜碱烧伤愈合<sup>[12]</sup>。Sosne 等<sup>[6]</sup>研究 Tβ4 在体外对角膜碱烧伤后 NF-κB 的作用,发现 NF-κB 的活性被降低,细胞核内 p65 蛋白的表达量降低,可能 Tβ4 是通过抑制 NF-κB 来调节角膜炎症反应的程度。我们利用免疫组织化学染色观察角膜碱烧伤后 NF-κB 的表达,发现 NF-κB 在上皮基底层表达最多,基质层只在巨噬细胞和中性粒细胞周围有表达,内皮全层阳性,统计平均光密度发现在 7d 和 14d 在 Tβ4 低剂量组 ( $P < 0.01$ ) 和中剂量组 ( $P < 0.05$ ) 比对照组低。因为 NF-κB 激活后必须转位到细胞核内才能发挥其转录活性,我们抽提了角膜组织细胞核蛋白,利用 ELISA 定量分析 p65 亚基的表达,发现在 3, 7 和 14d 时

细胞核内的 NF-κB p65 亚基表达比阴性对照和阳性对照组低 ( $P < 0.01$ ),说明 Tβ4 抑制细胞核内有效 NF-κB 的表达量。与免疫组化染色结果比较,发现 NF-κB 表达降低的时间点提前(免疫组化在 7d 才发现降低),可能因为免疫组化显示全细胞内 NF-κB 的表达,而 ELISA 结果仅显示细胞核内 NF-κB 的表达。以上结果显示 Tβ4 可抑制 NF-κB 表达并阻止其向细胞内转移,为了显示这种抑制作用是否发生在激活 NF-κB 的上游通路,我们用免疫组化检测一种重要前炎症因子 IL-1β 的变化,发现在各个时间点 Tβ4 用药组与对照组无差异 ( $P > 0.05$ )。提示 Tβ4 可能对前炎症因子表达无调节作用,对 NF-κB 的抑制作用是在 NF-κB 的激活和核转位的过程中。现已证明,Tβ4 可通过多种途径促进损伤组织修复,随着相关作用机制不断被揭示和阐明,它有望成为促进角膜创伤愈合,尤其是糖尿病视网膜病变、角膜溃疡和角膜手术后创伤愈合的新的治疗药物。

### 参考文献

- 1 郑晓汾,冯克孝,李冰,等. 兔角膜碱烧伤后不同时期的组织病理学变化. 国际眼科杂志 2005;5(3):449-450
- 2 Zhang X, Kohli M, Zhou Q, et al. Short- and long-term effects of IL-1 and TNF antagonists on periodontal wound healing. *J Immunol* 2004; 173: 3514-3523
- 3 Zhang J, Wu XY, Yu FS. Inflammatory responses of corneal epithelial cells to Pseudomonas aeruginosa infection. *Curr Eye Res* 2005;30:527-534
- 4 Moon HS, Even-Ram S, Kleinman HK, et al. Zyxin is upregulated in the nucleus by thymosin beta 4 in SiHa cells. *Exp Cell Res* 2006;312: 3425-3431
- 5 Qiu P, Kurpakus-Wheaton M, Sosne G. Matrix metalloproteinase activity is necessary for thymosin beta 4 promotion of epithelial cell migration. *J Cell Physiol* 2007;212:165-173
- 6 Sosne G, Qiu P, Christopherson PL, et al. Thymosin beta 4 suppression of corneal NFκB; a potential anti-inflammatory pathway. *Exp Eye Res* 2007;84:663-669
- 7 Sosne G, Albeiruti AR, Hollis B, et al. Thymosin beta 4 inhibits benzalkonium chloride-mediated apoptosis in corneal and conjunctival epithelial cells *in vitro*. *Exp Eye Res* 2006;83:502-507
- 8 Li Y, Wang G, Yu H, et al. Expression of laminin 5 in rat skin wounds regulated by recombinant thymosin beta 4. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waikē Zazhi* 2008;22:1306-1310
- 9 Sosne G, Chan CC, Thai K, et al. Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and modulates inflammatory mediators *in vivo*. *Exp Eye Res* 2001;72:605-608
- 10 Girardi M, Sherling MA, Filler RB, et al. Anti-inflammatory effects in the skin of thymosin-beta 4 splice-variants. *Immunology* 2003;109:1-7
- 11 Young JD, Lawrence AJ, MacLean AG, et al. Thymosin beta 4 sulfoxide is an anti-inflammatory agent generated by monocytes in the presence of glucocorticoids. *Nat Med* 1999;5:1424-1427
- 12 Saika S, Miyamoto T, Yamanaka O, et al. Therapeutic effect of topical administration of SN50, an inhibitor of nuclear factor-kappaB, in treatment of corneal alkali burns in mice. *Am J Pathol* 2005; 166: 1393-1403
- 13 Sun HQ, Yin HL. The beta-thymosin enigma. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1112:45-55
- 14 Merle H, Gerard M, Schrage N. Ocular burns. *J Fr Ophtalmol* 2008; 31:723-734