

• 论著 •

羟乙基淀粉 130/0.4 对 P38 丝裂素活化蛋白激酶信号转导通路的影响

王云霞 皋源 田捷 李玮伟 王祥瑞

【摘要】 目的 观察羟乙基淀粉 130/0.4(万汶)对 P38 丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路的影响,探讨其对感染所致急性肺损伤(ALI)保护作用的机制。**方法** 雄性 SD 大鼠 30 只,按随机数字表法分为正常对照组、脂多糖(LPS)组(LPS 10 mg/kg)、万汶 15 ml/kg 组(LPS 10 mg/kg+羟乙基淀粉 130/0.4 15 ml/kg)、万汶 30 ml/kg 组(LPS 10 mg/kg+羟乙基淀粉 130/0.4 30 ml/kg)及万汶对照组(羟乙基淀粉 130/0.4 30 ml/kg),颈内静脉注入 LPS 10 mg/kg 复制 ALI 模型。6 h 后处死大鼠,采集肺脏观察肺组织病理学变化;用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测肺组织 p-P38、P38、p-P44/42 和 P44/42 的表达;用凝胶电泳法(EMSA)检测活化蛋白 1(AP-1)的 DNA 结合活性。**结果** 与正常对照组比较,LPS 组表现为 P38 及 P44/42 的磷酸化水平增高,肺组织 AP-1 表达上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$);万汶 15 ml/kg 和 30 ml/kg 均可抑制 LPS 导致的 P38 磷酸化(P 均 <0.05),同时可明显抑制 AP-1 的活性(P 均 <0.05);万汶两个剂量组间比较差异无统计学意义(P 均 >0.05)。**结论** 羟乙基淀粉 130/0.4 通过抑制 P38 MAPK 信号转导通路中 P38 的磷酸化,进而使其下游的 AP-1 活性降低,减轻机体炎症反应。

【关键词】 羟乙基淀粉 130/0.4; P38 丝裂素活化蛋白激酶; 急性肺损伤; 炎症反应

Effects of hydroxyethyl starch 130/0.4 on P38 mitogen-activated protein kinases signal transduction pathway
WANG Yun-xia, GAO Yuan, TIAN Jie, LI Wei-wei, WANG Xiang-rui. Department of Anesthesiology, Renji Hospital, Medicine of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China
Corresponding author: GAO Yuan, Email: gaoyuan2004@hotmail.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of hydroxyethyl starch 130/0.4 (voluven) on P38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) signal transduction pathway, with the aim of investigating the mechanism of its protective effect on acute lung injury (ALI) due to infection. **Methods** Thirty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group, lipopolysaccharide (LPS 10 mg/kg) group, voluven groups (LPS 10 mg/kg, and hydroxyethyl starch 130/0.4 15 ml/kg or 30 ml/kg) and alone voluven group (hydroxyethyl starch 130/0.4 30 ml/kg), with 6 rats in each group. Rats were sacrificed at 6 hours, the lungs were harvested for observation of pathological changes. The expression of p-P38, P38, p-P44/42 and P44/42 were detected with Western blotting. Activating protein-1 (AP-1) activation was measured with electrophoretic mobility shift assay (EMSA). **Results** Compared with control, p-P38, p-P44/42 and AP-1 were significantly higher in LPS group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The expressions of p-P38 and AP-1 activation were significantly reduced in both voluven groups (all $P<0.05$). But there was no statistically significant difference between voluven 15 ml/kg and 30 ml/kg groups (all $P>0.05$). **Conclusion** Hydroxyethyl starch 130/0.4 can inhibit LPS-induced ALI by depressing expression of p-P38 and AP-1 activation in lung.

【Key words】 hydroxyethyl starch 130/0.4; P38 mitogen-activated protein kinases; acute lung injury; inflammation

羟乙基淀粉 130/0.4 是临床容量治疗中最重要的胶体液之一。多项研究表明,用羟乙基淀粉进行容量替代治疗能显著改善感染时最常受累的肺组织损伤,显示出明显的保护作用^[1-3]。我们前期研究表明,羟乙基淀粉 130/0.4 可下调脂多糖(LPS)感染导致急性肺损伤(ALI)时 Toll 样受体 4(TLR4)的表达,

说明 TLR4 信号转导通路是 LPS 感染炎症发展的重要通路(待发表)。由此我们设想,羟乙基淀粉 130/0.4 是否是通过影响 TLR4 信号转导通路上诱导炎症介质表达的上游转录因子或激酶,从而产生抑制炎症反应的作用?本实验中拟 LPS 致 ALI 大鼠模型,进一步探讨羟乙基淀粉 130/0.4(万汶)改善机体严重炎症反应紊乱状态的确切机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型及实验方法: 清洁级健康雄性 SD 大鼠,体重 250~300 g,购自中国科学院上海实验动物

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.05.005

基金项目:上海市医药卫生“百人计划”基金项目(2003-77-20)

作者单位:200127 上海交通大学医学院附属仁济医院麻醉科

通信作者:皋源,Email:gaoyuan2004@hotmail.com

中心。按随机数字表法分为 5 组。正常对照组、LPS 组、万汶 15 ml/kg 组(羟乙基淀粉 130/0.4 15 ml/kg)、万汶 30 ml/kg 组(羟乙基淀粉 130/0.4 30 ml/kg)、万汶对照组(羟乙基淀粉 130/0.4 30 ml/kg), 每组 6 只。水合氯醛麻醉大鼠, 右侧颈内静脉置管, 连接输液泵。各组分别经大鼠颈内静脉注射 LPS (E. Coli. O111: B4, 美国 Sigma 公司) 10 mg/kg 或等量生理盐水, 1 min 后以 0.2 ml/min 的速率由右颈内静脉持续输入不同剂量的羟乙基淀粉 130/0.4 溶液(费森尤斯卡比); 正常对照组和 LPS 组则输入 30 ml/kg 生理盐水。LPS 感染后 6 h 采集大鼠肺组织, 取右上肺组织, 用多聚甲醛水溶液固定, 行病理切片; 其余肺组织剪碎放入液氮中保存待检。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 p-P38、P38、p-P44/42、P44/42 的表达: 取大鼠左下肺组织, 剪碎加入一定比例裂解液, 冰浴条件下进行匀浆, 离心去除沉淀, 用考马斯亮蓝染色法进行蛋白定量。每份样本取 5 μ g 总蛋白上样, 用变性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 将蛋白转移至硝酸纤维素膜后, 用含脱脂牛奶的 TBS 封闭, 加 1:1 000 稀释的一抗(兔抗鼠 P38、p-P38 抗体或 P44/42、p-P44/42 抗体, 美国 Cell Signaling 公司)过夜, 洗膜后加 1:2 000 稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体, 美国 Santa Cruz 公司), 室温下摇床杂交 1 h, 用化学发光法(ECL)检测阳性信号, 用成像系统采集 X 线片上的结果图像, 用 Quantity One 4.4 图像分析软件分析每个特异条带的灰度值。分别以 p-P38 与总 P38 和 p-P44/42 与总 P44/42 积分吸光度比值来反映 P38 和 P44/42 磷酸化的程度, 即 p-P38 和 p-P44/42 的表达水平。

1.2.2 凝胶电泳迁移法(EMSA)检测活化蛋白 1 (AP-1)结合活性: 抽提组织核蛋白, 试剂盒购自美国 PIERCE 公司, 具体操作步骤按照说明书进行。用 BCA 蛋白质定量试剂盒(S-430)进行蛋白定量。AP-1 寡核苷酸探针序列为 P1: 5'-CGCTTGAT GACTCAGCCGGA-3'; P2: 5'-TTCCGGCTGA GTCATCAAGCG-3'。提取的核蛋白经过含有结合缓冲液、poly[d(I-C)], poly L-赖氨酸、地高辛标记的寡核苷酸探针及 ddH₂O 的反应体系, 室温反应 15 min, 反应产物经非变性 PAGE、电转印至正电荷尼龙膜、交联、封闭非特异性结合位点后, 加入抗地高辛-碱性磷酸酶抗体(瑞士 Roche 公司)反应, 洗

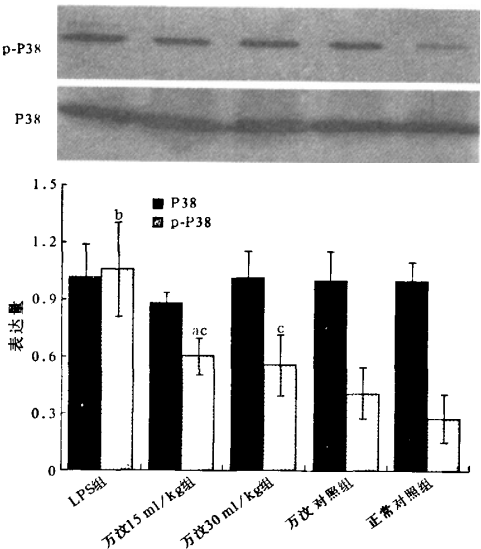
涤, 加入化学发光底物 CSPD(瑞士 Roche 公司), 曝光。AP-1 与标记的寡核苷酸探针结合, 使探针在电泳中的迁移率降低形成滞后的电泳条带, 即结合带, 用图像分析软件分析结合带的灰度值。

1.2.3 组织病理学观察: 取肺组织约 1 cm $\times$ 1 cm, 用多聚甲醛水溶液固定 24 h, 石蜡包埋、切片, 苏木素-伊红(HE)染色, 显微镜下观察。

1.3 统计学处理: 使用 SPSS 14.0 统计软件包, 数据以均数 $\pm$ 标准误($\bar{x}\pm s_x$)表示, 多样本均数比较用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织 P38 和 p-P38 表达(图 1): 各组肺组织 P38 表达差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。与正常对照组比较, LPS 组 p-P38 表达显著增高($P<0.01$), 这个过程可被不同剂量万汶所抑制。与 LPS 组比较, 万汶 15 ml/kg 组和 30 ml/kg 组 p-P38 表达水平均明显降低(P 均 <0.05), 但两个治疗组间差异无统计学意义($P>0.05$)。



注: 与正常对照组比较, $^aP<0.05$, $^bP<0.01$; 与 LPS 组比较, $^cP<0.05$

图 1 不同剂量万汶治疗后大鼠肺组织 P38 和 p-P38 的表达

2.2 肺组织 P44/42 和 p-P44/42 表达(图 2): 各组肺组织 P44/42 表达差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。与正常对照组比较, LPS 组 p-P44/42 表达显著增高($P<0.05$); 与 LPS 组比较, 万汶各组 p-P44/42 表达差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

2.3 肺组织 AP-1 DNA 结合活性(图 3): 正常对照

组肺组织 AP-1 表达水平较低。LPS 作用 6 h 后肺组织 AP-1 表达明显上升 ($P < 0.01$)。万汶各组 AP-1 活性均明显抑制 (P 均 < 0.05)，但这种抑制作用在万汶 15 ml/kg 组和 30 ml/kg 组间无明显差异。万汶对照组 AP-1 活性与正常对照组相近。

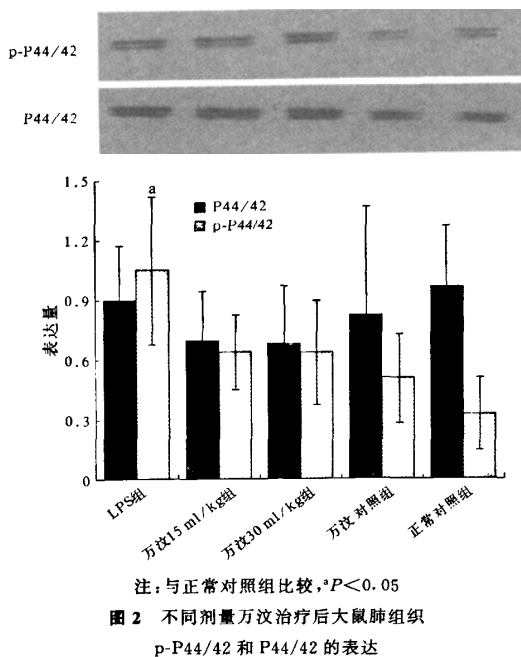


图2 不同剂量万汶治疗后大鼠肺组织 p-P44/42 和 P44/42 的表达

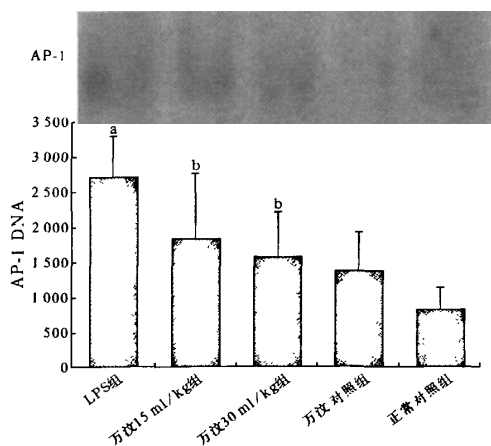


图3 EMSA 检测各组大鼠肺组织 AP-1 DNA 结合活性的变化

2.4 组织病理学改变:光镜下正常对照组大鼠肺泡结构正常。LPS 组肉眼可见肺脏表面淤血、出血点和水肿明显;光镜下病理改变以肺间质病变为主,肺毛细血管明显扩张、充血,白细胞附壁,肺泡隔增宽,

大量白细胞渗出、聚集,少量淋巴细胞及单核细胞浸润,部分肺泡腔中可见渗液、出血以及萎陷不张。万汶 15 ml/kg 组肺组织炎性细胞浸润减少。万汶 30 ml/kg 组肺组织炎性细胞浸润明显减少,肺结构基本接近正常对照组。

3 讨论

ALI 是急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的早期阶段,其实质是肺部失控的炎症反应及促炎/抗炎因子失衡^[4]。ARDS 虽然表现为氧合降低,但许多研究表明改善氧合并不能改善患者的长期预后和病死率。可见 ARDS 的治疗目标主要不在改善氧合,控制炎症反应是关键。

羟乙基淀粉 130/0.4 是临床容量治疗中最重要的胶体液之一。研究表明,用羟乙基淀粉进行容量替代治疗,能够显著改善感染时最常受累的肺组织损伤,显示出明显的保护作用^[1-3]。这一作用与其抑制组织中促炎因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、黏附分子 CD11b 和细胞因子诱导中性粒细胞化学趋化因子 (CINC) 表达,减轻肺组织中性粒细胞 (PMN) 浸润有关^[5-6]。进一步研究发现,这种改善作用在于羟乙基淀粉对炎症介质的影响,如抑制血浆白细胞介素-6 (IL-6)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 的表达^[7-8];降低促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、趋化因子 IL-8 的水平,提高抗炎因子 IL-10 的水平,抑制核转录因子- κ B (NF- κ B)、AP-1、髓过氧化物酶 (MPO) 活性^[9-10];降低巨噬细胞炎性蛋白 2 (MIP-2) 的表达^[11]。

我们前期的研究已显示,羟乙基淀粉 130/0.4 可能通过抑制 TLR4 的表达而减轻炎症反应(待发表)。TLR4 信号转导通路是 LPS 感染后导致炎症发展最重要通路。P38MAPK 信号转导通路的激活在 LPS 诱导 ALI 的致病机制中发挥着重要的调节作用^[6]。通路的激活表现为细胞内形成磷酸化的 P38MAPK。本实验发现,各组肺组织 P38 表达水平无明显差异。LPS 组表现为 p-P38 水平显著增高,这个过程可以被不同剂量的羟乙基淀粉 130/0.4 所抑制,这和我们前期实验中得出 TLR4 的变化趋势是一致的,说明 P38 的磷酸化是通过 TLR4 活化所致。P38MAPK 被激活后可进入到细胞核或转移到其他部位,激活下游的激酶或多种转录因子^[12]。在炎症状态下,磷酸化的 P38MAPK 可与许多细胞因子启动子区的 AP-1 位点结合,从而使炎症相关基因表达增强。由此我们推测,羟乙基淀粉 130/0.4 也可以抑制 AP-1 的活性。为了证明这一点,我们用

EMSA检测了肺组织 AP-1 DNA 结合活性的变化,结果发现正常对照组肺组织 AP-1 表达较低;LPS 刺激 6 h 后明显上升;羟乙基淀粉 130/0.4 明显抑制了 AP-1 的活性。AP-1 激活后可上调多种致炎因子的表达,如 TNF- α 、IL-1、IL-8、MIP-2 以及各种黏附分子等^[13-15];而羟乙基淀粉 130/0.4 可以降低这些炎症介质的表达^[7,11]。

综上所述,P38MAPK 信号通路在炎症反应中扮演着十分重要的角色。羟乙基淀粉 130/0.4 可能是通过抑制 TLR4 的表达,从而使 P38 磷酸化水平降低,进而抑制 AP-1 活性,改善 LPS 导致的 ALI,发挥其改善炎症反应的作用。

参考文献

- [1] Schmand JF, Ayala A, Morrison MH, et al. Effects of hydroxyethyl starch after trauma-hemorrhagic shock: restoration of macrophage integrity and prevention of increased circulating interleukin-6 levels. *Crit Care Med*, 1995, 23(5):806-814.
- [2] Boldt J, Muller M, Heesen M, et al. Influence of different volume therapies and pentoxifylline infusion on circulating soluble adhesion molecules in critically ill patients. *Crit Care Med*, 1996, 24(3):385-391.
- [3] 邱一真,孙华,李峰,等.人工胶体液对感染性休克犬血管通透性及血管内皮细胞生长因子的影响. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(5):270-273.
- [4] 张青,李琦,毛宝龄,等.内毒素致伤大鼠肺组织促炎与抗炎细胞因子 mRNA 表达的时相性研究. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(10):585-588.
- [5] Tian J, Lin X, Guan R, et al. The effects of hydroxyethyl starch on lung capillary permeability in endotoxic rats and possible mechanisms. *Anesth Analg*, 2004, 98(3):768-774.
- [6] 田婕,徐建国.羟乙基淀粉对内毒素感染大鼠肺部毛细血管通透性的影响. *中华麻醉学杂志*, 2004, 24(2):122-125.
- [7] Nick JA, Young SK, Brown KK, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in a murine model of pulmonary inflammation. *J Immunol*, 2000, 164(4):2151-2159.
- [8] Zu YL, Qi J, Gilchrist A, et al. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF- α or FMLP stimulation. *J Immunol*, 1998, 160(4):1982-1989.
- [9] Feng X, Yan W, Liu X, et al. Effects of hydroxyethyl starch 130/0.4 on pulmonary capillary leakage and cytokines production and NF- κ B activation in CLP-induced sepsis in rats. *J Surg Res*, 2006, 135(1):129-136.
- [10] Lv R, Zhou W, Yang JJ, et al. Hydroxyethyl starch inhibits intestinal production of cytokines and activation of transcription factors in endotoxaemic rats. *J Int Med Res*, 2005, 33(4):379-388.
- [11] Feng X, Yan W, Wang Z, et al. Hydroxyethyl starch, but not modified fluid gelatin, affects inflammatory response in a rat model of polymicrobial sepsis with capillary leakage. *Anesth Analg*, 2007, 104(3):624-630.
- [12] Yang RB, Mark MR, Gray A, et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*, 1998, 395(6699):284-288.
- [13] Nick JA, Avdi NJ, Young SK, et al. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *J Clin Invest*, 1997, 99(5):975-986.
- [14] Pålsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 2004, 113(2):153-162.
- [15] 王晓辉,颜光涛,张凯,等. p38 丝裂原活化蛋白激酶/胞浆型磷脂酶 A₂ 途径介导炎症细胞模型中白细胞介素的生成. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(1):31-35.

(收稿日期:2009-02-12 修回日期:2009-04-20)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

大麻素受体拮抗剂影响下丘脑视前区去甲肾上腺素释放治疗脓毒症低血容量

脂多糖(LPS)刺激肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及其他血管活性物质释放导致血压降低。目前研究表明,炎症信号通过迷走神经传导至中枢神经,下丘脑视前区(POA)可能参与感染性休克的发生;通过抑制 POA 肾上腺素 α 受体,降低迷走神经活性,可治疗 LPS 导致的低血压。由于下丘脑表达大麻素-1(CB1)受体合成,研究人员设想 CB1 受体可能参与了内毒素血症时动脉血压的调节。研究结果发现,静脉滴注利莫那班(CB1 拮抗剂)可防止 LPS 导致的动脉血压下降,预防 LPS 导致的去甲肾上腺素水平和 TNF- α 水平升高。提示 CB1 在 LPS 导致的动脉血压降低中发挥重要作用。

白慧颖,编译自《Shock》,2009 年 3 月(电子版);胡森,审校

血清乳酸水平与脓毒症病死率、脓毒性休克及器官功能衰竭的关系

研究人员设想血清乳酸水平可能与严重脓毒症病死率相关,但与器官功能衰竭和休克无关。为了证明这一假设,研究者将患者 28 d 病死率作为观察终点,以静脉血乳酸含量作为危险因素,并分层设为低(血乳酸 < 2.0 mmol/L)、中(血乳酸 $2.0 \sim 3.9$ mmol/L)、高(血乳酸 ≥ 4.0 mmol/L)3 组;相关变异指标包括年龄、性别、种族、急性慢性器官功能障碍以及是否早期治疗;多元线性回归用于分析是否出现休克。830 例成年严重脓毒症患者纳入研究,28 d 病死率为 22.9%,血清乳酸含量均值 2.9 mmol/L。校正可能的混杂因素后,血清乳酸水平与患者是否出现休克无关;血清乳酸含量中、高组的乳酸水平与病死率相关。研究人员得出结论,血清乳酸水平与严重脓毒症病死率相关,但与器官功能衰竭和休克无关;中、高含量乳酸水平均与病死率相关。

白慧颖,编译自《Crit Care Med》,2009 年 5 月(电子版);胡森,审校