

乌司他丁对热打击诱导人肠上皮细胞释放 白细胞介素-8 与 p38 信号通路的研究

刘志锋^{1a}, 唐丽群^{1a}, 曾平², 李炳玲^{1b}, 孙学刚³, 童华生^{1a}, 孟繁魁^{1a}, 苏磊^{1a}

(1. 广州军区广州总医院①ICU, ②药剂科, 广东 广州 510010; 2. 广东省医学科学院广东省老年医学研究所心内科, 广东 广州 510080; 3. 南方医科大学中医药学院分子生物学实验室, 广东 广州 510515)

【摘要】 目的 研究乌司他丁对热打击诱导人肠上皮细胞释放细胞因子的影响以及可能参与调控的信号通路。**方法** 用不同温度的热打击(39、41、43℃)1 h 刺激培养的人肠上皮细胞株(SW480)后, 继续于 37℃ 下培养 24 h, 收集细胞和细胞上清液。另将细胞进行热打击(43℃, 1 h), 同时加用 100 kU/L 和 1 000 kU/L 的乌司他丁继续于 37℃ 下培养 24 h 后收集细胞和细胞上清液; 用酶联免疫吸附法(ELISA)检测上清液中白细胞介素-8(IL-8)的含量, 用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测细胞裂解液中 p38 蛋白表达。**结果** 低温度的热打击(39℃)对 SW480 细胞分泌 IL-8 没有诱导作用, 但高温(41℃、43℃)可明显诱导 IL-8 水平的升高(均 $P < 0.01$); 而乌司他丁可明显抑制热打击对 SW480 细胞 IL-8 的诱导表达作用(均 $P < 0.01$), 尽管大剂量乌司他丁对 IL-8 的抑制作用较小剂量组更加明显, 但两个剂量乌司他丁组间无明显差异。不同温度的热打击可诱导 SW480 细胞 p38 表达上调, 并具有一定剂量依赖效应(均 $P < 0.01$)。而乌司他丁不仅可以抑制 SW480 细胞 p38 的基础表达水平, 并且小剂量的乌司他丁即可明显抑制热打击对 p38 的诱导表达作用($P < 0.01$), 但两个剂量乌司他丁组间无明显差异。**结论** 乌司他丁可能通过降低 p38 表达来抑制热打击对肠上皮细胞释放 IL-8 的诱导作用, 但同时也存在其他信号通路参与的可能, 这为理解肠屏障细胞的炎症反应在重症中暑中肠道细菌和内毒素移位中的作用机制提供了一定的实验基础, 也为乌司他丁作为免疫调节剂未来用于治疗重症中暑提供了实验依据。

【关键词】 热打击; 白细胞介素-8; 肠上皮细胞; 乌司他丁; 重症中暑

中图分类号: R965; Q813.1 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.02.006

A study of effects of ulinastatin on interleukin-8 secretion and p38 signal pathway in human intestinal epithelial cells with heat stress LIU Zhi-feng*, TANG Li-qun, ZENG Ping, LI Bing-ling, SUN Xue-gang, TONG Hua-sheng, MENG Fan-su, SU Lei. * Department of Intensive Care Unit, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong, China
Corresponding author: SU Lei, Email: slei_icu@163.com

【Abstract】 Objective To study the effects of ulinastatin on release of interleukin-8 (IL-8) from human intestinal epithelial cells induced by heat stress and the possibly involved signal pathway in regulation. **Methods** Human intestinal epithelial cells of a strain (SW480) were stimulated with different degrees of heat stress (in an incubator with 39, 41, 43℃ for 1 hour, respectively), and then were re-cultured in 37℃ for another 24 hours. The cells and supernatant were collected. In another group, different doses of ulinastatin (100 kU/L or 1 000 kU/L) were added to cultured SW480 cells with heat stress (43℃ for 1 hour) and the cells were further cultured in 37℃ for 24 hours, and then the cells and supernatant were collected. The levels of IL-8 in supernatant were detected with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of p38 in SW480 cell cleavage fluid was detected by Western blotting assay. **Results** The low degree of heat stress (39℃) did not have any inducing effect on SW480 cells to release IL-8, while the high degrees (41℃ and 43℃) could induce the elevation of IL-8 level significantly (both $P < 0.01$). Ulinastatin could obviously inhibit the up-regulation of IL-8 induced by heat stress (both $P < 0.01$) and the effect was dose-dependent. Despite the inhibiting effect of higher dose was more obvious than that of lower dose, there was no significant difference statistically. Moreover, various degrees of heat stress capable of up-regulating the expression of p38 were also in a degree dependent manner in SW480 cells to a certain extent (all $P < 0.01$). Ulinastatin not only could inhibit the basic p38 expression in SW480 cells, but also its low dose might markedly suppress the p38 expression induced by heat stress ($P < 0.01$). However, in comparison, the effects of the two doses of ulinastatin on IL-8 secretion had no statistical significant difference. **Conclusion** Ulinastatin possibly can inhibit the IL-8 secretion from human intestinal epithelial cell line (SW480) induced by heat stress via decreasing the expression of p38, but simultaneously other signal pathway may also be involved. The results of this study may provide an experimental base to understand the mechanism of inflammatory reaction of intestinal barrier cells in cases with severe heat stroke and translocation of intestinal bacteria and endotoxin. Based on this study, ulinastatin may be applied for treatment of severe heat stroke as an immune regulating agent in future.

【Key words】 Heat stress; Interleukin-8; Intestinal epithelial cell; Ulinastatin; Severe heatstroke

当前的研究普遍认为,重症中暑的病理生理反应并不仅仅是由热暴露的直接损伤引起,而更多的表现是继发于热损伤之后的全身炎症反应综合征(SIRS),进而引发多器官功能障碍综合征(MODS)的过程^[1]。由热应激发展至中暑的过程中,肠道作为体内最大的“储菌库”和“内毒素库”,以其在体内独特的生理环境参与中暑的发生,并进一步发展引发SIRS、脓毒症甚至MODS,但在此过程中,在胃肠道细胞,尤其是作为肠黏膜屏障的重要细胞——肠上皮细胞经历了怎样的分子变化,一直没有切实可靠的实验依据。基于此,本课题组前期模拟中暑时肠上皮细胞所处的微环境,即受热打击和肠道内毒素双重作用情况下,热打击可明显诱导人肠上皮细胞株(SW480)分泌白细胞介素-8(IL-8)升高,说明肠屏障细胞的炎症反应在中暑肠道病变中可能发挥了重要作用^[2]。为进一步明确热打击对肠道炎症反应时可能参与调控的信号机制,以及免疫调节剂对炎症反应的作用,本研究中观察乌司他丁对热打击诱导人肠上皮细胞释放细胞因子的影响及可能参与调控的信号通路,以期明确肠屏障细胞的炎症反应在肠道细菌和内毒素移位中的作用机制提供更深入的实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂: RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco BRL 公司;胎牛血清(FBS)购自美国 HyClone 公司;细胞培养皿购自美国 Corning 公司;IL-8 检测试剂盒购自广州威佳生物公司;兔抗人 p38 抗体和兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体购自美国 Cell Signaling 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗兔 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司;SW480 细胞株由南方医院消化科馈赠。

1.2 细胞培养和实验分组: 将 SW480 细胞株复苏后,离心去上清液,用含 20% FBS 的 RPMI 1640 培养液混匀细胞后接种入培养皿中,37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养,次日换液,以后根据细胞生长情况 2~3 d 传代 1 次。实验前 1 d 以 1.0×10^5 个/孔密度将 SW480 接种于培养皿中培养 24 h,更换无血清培养液培养 6 h 后进行分组,每组设 3 个平行孔,每个独立实验重复 3 次。实验分组:将培养的 SW480 细胞分别置于 39、41、43 °C 培养箱中 1 h 后将细胞重新

置于 CO₂ 培养箱中继续培养 24 h 后收集细胞和细胞上清液,对照组细胞始终置于 37 °C 培养箱中培养。乌司他丁处理组开始孵育细胞时分别加用 100 kU/L 和 1 000 kU/L 的乌司他丁,43 °C 热打击 1 h 后置于培养箱中继续培养 24 h,收集细胞和细胞上清液,同时设单用乌司他丁 1 000 kU/L 对照组。

1.3 细胞培养上清液中 IL-8 含量以及细胞 p38 的测定: 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 IL-8,操作按试剂盒说明书进行。细胞孵育结束后,用冷磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗细胞,每孔加入 150 μ l 冰预冷的细胞裂解缓冲液,冰上裂解细胞,离心取上清液,分别以兔抗 p38 抗体(1 : 1 000 稀释)和兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(1 : 1 000 稀释)为一抗,HRP 标记的抗兔 IgG(1 : 1 000 稀释)为二抗行蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测;经 Image Station 2000R 图像工作站取像并进行吸光度(A)分析,以 p38/ β -actin 的 A 值比值表示相对表达量。

1.4 统计学处理: 使用 SPSS 13.0 统计软件,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同温度热打击对肠上皮细胞 IL-8 分泌量的影响及乌司他丁的干预作用(表 1): 39 °C 的热打击对肠上皮细胞 IL-8 分泌量没有作用,但高温热打击(41 °C 或 43 °C)则可以明显诱导 IL-8 的分泌,分别约为对照组的 3.2 倍和 4.5 倍,与对照组比较差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。小剂量(100 kU/L)乌司他丁即可明显抑制高温热打击对 SW480 细胞分泌 IL-8 的作用(均 $P < 0.01$),尽管对照组大剂量乌司他丁对 IL-8 的抑制作用更加明显,但不同剂量乌司他丁预处理组间相比差异无统计学意义。此外,乌司他丁 1 000 kU/L 还可以明显抑制 SW480 细胞的基础 IL-8 分泌水平($P < 0.01$)。

表 1 乌司他丁对热打击诱导肠上皮细胞 IL-8 分泌量和 p38 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	IL-8(μ g/L)	p38 蛋白
37 °C 对照组	3	23.57 $\pm$ 7.16	45.6 $\pm$ 12.7
39 °C 热打击组	3	22.69 $\pm$ 8.57	79.4 $\pm$ 18.2 ^b
41 °C 热打击组	3	75.21 $\pm$ 15.41 ^b	130.7 $\pm$ 27.3 ^b
43 °C 热打击组	3	106.69 $\pm$ 21.75 ^b	160.5 $\pm$ 31.7 ^b
37 °C 乌司他丁对照组	3	7.35 $\pm$ 3.52 ^b	12.3 $\pm$ 5.1 ^b
43 °C 乌司他丁 100 kU/L 组	3	51.76 $\pm$ 17.73 ^{ac}	33.5 $\pm$ 9.2 ^c
43 °C 乌司他丁 1 000 kU/L 组	3	31.60 $\pm$ 12.30 ^c	27.4 $\pm$ 7.3 ^c

注:与 37 °C 对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,与 43 °C 热打击组比较,^c $P < 0.01$

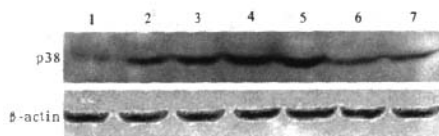
2.2 不同温度热打击诱导肠上皮细胞 p38 蛋白表

基金项目:中国博士后基金资助(20080431419,200902659)

通信作者:苏磊,Email:slei_icu@163.com

作者简介:刘志锋(1977-),男(汉族),河南省人,博士后,主治医师。

达的影响及乌司他丁的干预作用(表 1; 图 1); 不同温度的热打击对 SW480 细胞 p38 蛋白的表达均有上调作用, 且呈一定的剂量依赖效应(均 $P < 0.01$)。小剂量乌司他丁就可以明显抑制高温热打击对 p38 蛋白的诱导表达作用(均 $P < 0.01$), 并基本接近对照组水平, 但乌司他丁两个剂量组间无明显差异; 此外, 乌司他丁 1 000 kU/L 也可以明显抑制 SW480 细胞的基础 p38 蛋白表达水平。



1: 37 °C 乌司他丁(1 000 kU/L)对照组; 2: 37 °C 对照组;
3~5: 39、41、43 °C 热打击组; 6~7: 43 °C 热打击联合 100 kU/L、
1 000 kU/L 乌司他丁刺激组

图 1 Western blotting 检测乌司他丁对热打击诱导
肠上皮细胞 p38 表达的影响

3 讨论

过去 20 年的研究认为, 中暑是由热调节功能失调引起的, 伴随着剧烈的急性期反应和热休克蛋白表达的改变, 接踵而来的多器官损伤是由热的细胞毒性作用和炎症反应以及宿主的凝血反应之间复杂的相互作用引起^[3]。新的研究认为, 中暑的病理生理学反应并不是由热暴露的直接损伤引起, 而是一种继发于热损伤之后的 SIRS, 进而引发 MODS 的过程^[1]。现已注意到, 在重症患者各种病理生理状态下, 肠道功能障碍可能是引起 SIRS 的启动因子和刺激因子, 是脓毒症、MODS 的“发动机”^[4]。1986 年 Meckins 和 Marshall 首先提出肠道是发生 MODS 的原动力^[5]。近年来的研究进一步表明, 肠道作为体内最大的“储菌库”和“内毒素库”, 以其在体内独特的生理环境参与 SIRS 和 MODS 的病理生理过程。现在认为肠道是 MODS 的枢纽器官, 是炎症介质的扩增器, 肠源性感染和肠道内细菌与毒素移位已受到临床高度重视^[6-7]。在对重症中暑的研究中也已经发现存在有明确的胃肠病变, 主要表现为肠道黏膜受损, 肠上皮细胞凋亡、肠通透性增加, 肠道细菌向周围淋巴结、肝、脾移位, 对内毒素的渗漏率增加, 同时发现胃肠道的病理学改变同发热程度、降温和死亡的时间有关, 并且胃肠道病变同中暑患者复苏后期病情的加重甚至死亡有着重要联系, 这点同内毒素休克、多器官功能衰竭和肠道再灌注损伤之间也是惊人的相似^[8-10]。但在此过程中, 在分子水平胃肠

道细胞, 尤其是作为肠黏膜屏障的重要细胞肠上皮细胞经历了怎样的分子变化, 一直没有切实可靠的实验依据。这也使我们在临床上期望从消化系统途径进行干预, 从而阻止中暑发生发展以降低中枢病损率和病死率上, 缺乏理论认识和有利的治疗措施。

基于此, 本课题组前期模拟中暑时肠上皮细胞所处的微环境, 即受热打击和肠道内毒素双重作用下, 脂多糖(LPS)与热打击单独和联合作用对人肠上皮细胞释放细胞因子的诱导作用, 结果发现, 热打击可明显诱导 SW480 细胞分泌 IL-8 升高, 说明肠屏障细胞的炎症反应在中暑肠道病变中可能发挥了重要作用^[2]。本研究结果发现, 低温度的热打击对 SW480 细胞分泌 IL-8 没有诱导作用, 但高温可以明显诱导 IL-8 水平的升高, 说明细胞具有一定程度的热耐受性, 当热打击超过热耐受程度时, 就会通过分泌炎症介质参与到肠道的炎症反应中。另外, p38 信号转导通路是一个公认的炎症相关信号通路, 参与多种炎症介质的表达调控^[11]。本研究发现, 不同温度的热打击与 p38 表达间存在明显的剂量依赖效应, 并且 p38 蛋白表达水平与 IL-8 表达存在一定的平行关系, 说明细胞遭受热打击时 p38 信号转导通路可能是参与细胞热打击炎症反应的一个极为关键的信号分子。

乌司他丁是由肝脏分泌的具有广谱蛋白酶抑制作用的酶蛋白, 具有抑制过度炎症反应、减少组织损伤、改善微循环和组织灌注等药理作用^[12]。乌司他丁作为一种炎症反应的调节剂, 可下调多种促炎介质水平, 从而起到减轻炎症损害的目的。本研究中同样观察到乌司他丁可明显抑制热打击对 SW480 细胞 IL-8 的诱导表达作用, 此外, 还发现小剂量乌司他丁就可明显抑制热打击对 p38 的诱导表达, 这从反面也说明了 p38 表达水平同 IL-8 的表达可能存在一定的相关性。当然, 二者间的直接关系需要进一步采用 p38 信号通路的特异性抑制剂来验证。

深入分析本研究结果还发现, 尽管大剂量乌司他丁对热打击诱导 IL-8 的抑制作用更加明显, 但不同剂量组间无明显差异。由此推测, 乌司他丁可以抑制热打击对肠上皮细胞分泌 IL-8 的诱导作用, 但这种抑制作用仅是一部分或是大部分的抑制, 可能还存在其他与乌司他丁作用无关的机制参与了 IL-8 的表达上调。而在检测乌司他丁对热打击诱导 p38 表达的影响时则发现, 小剂量乌司他丁就可以基本完全抑制热打击对 p38 的诱导作用, 由此推断, 可能存在与 p38 通路无关的其他信号通路参与了 IL-8

的表达上调。研究还发现,单用乌司他丁就可以抑制 SW480 细胞 p38 和 IL-8 的基础表达水平,分析原因可能为所用的肠上皮细胞株 SW480 是源于结肠癌细胞,作为一种肿瘤细胞,可能本身就存在着持续高于正常细胞的 p38 和 IL-8 的表达。另外,作为体外培养的细胞,也可能存在某种程度的预刺激导致了基础 p38 和 IL-8 的表达水平升高,而乌司他丁对这两种情况都有一定的抑制作用。

参考文献

- [1] Leon LR, Blaha MD, DuBose DA. Time course of cytokine, corticosterone, and tissue injury responses in mice during heat strain recovery. *J Appl Physiol*, 2006, 100(4):1400-1409.
- [2] 刘志峰, 刘亚伟, 苏磊, 等. 脂多糖和热打击联合作用对人肠上皮细胞释放细胞因子的影响. *中国急救医学*, 2010, 待发表.
- [3] Bouchama A, Knochel JP. Heat stroke. *N Engl J Med*, 2002, 346(25):1978-1988.
- [4] Nieuwenhuijzen GA, Deitch EA, Goris RJ. The relationship between gut-derived bacteria and the development of the multiple organ dysfunction syndrome. *J Anat*, 1996, 189 (Pt 3):537-548.
- [5] Deitch EA. Multiple organ failure, pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg*, 1992, 216(2):117-134.

- [6] Lichtman SM. Bacterial translocation in humans. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2001, 33(1):1-10.
- [7] 董军, 张淑文, 王宝恩. 肠功能障碍与多器官功能障碍综合征. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(12):764-767.
- [8] Eshel GM, Safar P, Stezoski W. The role of the gut in the pathogenesis of death due to hyperthermia. *Am J Forensic Med Pathol*, 2001, 22(1):100-104.
- [9] Lambert GP, Gisolfi CV, Berg DJ, et al. Selected contribution: hyperthermia-induced intestinal permeability and the role of oxidative and nitrosative stress. *J Appl Physiol*, 2002, 92(4):1750-1761.
- [10] Roberts GT, Ghebeh H, Chishti MA, et al. Microvascular injury, thrombosis, inflammation, and apoptosis in the pathogenesis of heatstroke: a study in baboon model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(6):1130-1136.
- [11] Kan W, Zhao KS, Jiang Y, et al. Lung, spleen, and kidney are the major places for inducible nitric oxide synthase expression in endotoxic shock: role of p38 mitogen-activated protein kinase in signal transduction of inducible nitric oxide synthase expression. *Shock*, 2004, 21(3):281-287.
- [12] Shikimi T, Kaku K, Uegaki J, et al. Serum contents of the free forms of alpha 1-microglobulin and ulinastatin: relation to diseased states in patients with mood disorders. *Neuropsychobiology*, 2001, 43(3):145-149.

(收稿日期:2010-01-22)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国中西医结合急救杂志》对计量单位及数字的要求

《中国中西医结合急救杂志》执行 GB 3100~3102-1993《量和单位》中有关量、单位和符号的规定及其书写规则,具体写作方法可参照中华医学会杂志社编写的《法定计量单位在医学上的应用》。注意单位名称与单位符号不可混用。组合单位符号中表示相除的斜线多于 1 条时应采用负数幂的形式表示,组合单位中斜线和负数幂亦不可混用,例如:ng/kg/min 应采用 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式,不宜采用 $\text{ng}/\text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式。在叙述中应先列出法定计量单位数值,括号内写旧制单位数值;如果同一计量单位反复出现,可在首次出现时注出法定与旧制单位换算系数,然后只列法定计量单位数值。参量及其公差均需附单位,当参量与其公差的单位相同时,单位可只写 1 次,即加圆括号将数值组合,置共同单位符号于全部数值之后。例如:“75.4 ng/L $\pm$ 18.2 ng/L”可以表示为“(75.4 $\pm$ 18.2) ng/L”。量的符号一律用斜体字,如吸光度(旧称光密度)的符号“A”。根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质监局量函[1998]126 号文件《关于血压计量单位使用规定的补充通知》,凡是涉及人体及动物体内的压力测定,可以使用 mm Hg 或 cm H₂O 为计量单位,但首次出现时应注明 mm Hg 或 cm H₂O 与 kPa 的换算系数(1 mm Hg=0.133 kPa,1 cm H₂O=0.098 kPa)。

对于数字的表示,本刊执行 GB/T 15835-1995《出版物上数字用法的规定》。公历世纪、年代、年、月、日、时刻和计数、计量均用阿拉伯数字。百分数的范围和偏差,前一个数字的百分符号不能省略,例如:5%~95%不能写成 5~95%,(50.2 $\pm$ 0.6)%不能写成 50.2 $\pm$ 0.6%。附带尺寸单位的数值相乘,按下列方式书写:4 cm $\times$ 3 cm $\times$ 5 cm,不能写成 4 $\times$ 3 $\times$ 5 cm³。

《中国中西医结合急救杂志》对来稿的一般要求

文稿应具有科学性、创新性、实用性和导向性。要求资料真实、可靠,数据准确,必要时应进行统计学处理;文字精炼,层次清楚;论点明确,论据充分,结论清晰。应特别注意对研究过程和方法陈述的严谨性、逻辑关系的严密性、文字表述的流畅性。

来稿需经第一作者或通信作者所在单位审核,并附单位推荐信。推荐信应证明稿件内容和数据资料的真实性,注明对稿件的审评意见以及无一稿两投、不涉及保密、署名无争议等项,并加盖单位公章。如涉及保密问题,需附有关部门审查同意的证明。需要特别说明的是,科研论文一般具有职务作品的属性。为了保护知识产权,对于原创性研究论文,本刊要求稿件推荐信须由享有该研究知识产权的单位(即科研立项单位、病例资料所在单位)出具;多中心研究的推荐信可由作为该项研究主持者的第一作者或通信作者的所在单位出具。述评、综述、论坛类稿件不受上述规定限制。

欢迎作者通过 Email 投稿,《中国中西医结合急救杂志》的投稿邮箱:cccm@em120.com。对于 Email 投稿,还需再寄纸质稿件 2 份以及各类基金项目复印件。

《中国中西医结合急救杂志》一般不退还原稿,请作者自留底稿。若作者要求退还文中原始图片,请在投稿时特别声明。为了便于必要时编辑部与作者及时取得联系,请在文稿后注明第一作者或通信作者的联系方式(移动电话及 Email)。