

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.09.002

乌司他丁对脓毒症大鼠膈肌 p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路的影响

冯清洲, 刘 珏, 黄建鑫

(广东省深圳市第七人民医院重症医学科, 广东 深圳 518081)

摘要:目的 研究乌司他丁对脓毒症膈肌 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路的影响。方法 选取 60 例 SPF 级成年雄性 SD 大鼠,随机分为 A 组、B 组和 C 组,各 20 只;A 组为假手术组,B 组为脓毒症组,C 组为乌司他丁治疗组。麻醉后,A 组从正中线剪开大鼠腹部,然后对伤口进行缝合;B 组使用盲肠结扎穿孔(CLP)模型,将大鼠制成脓毒症动物模型;C 组大鼠在术后立即给予乌司他丁治疗。3 组大鼠在术后 16 h 内处死,观察膈肌肌条收缩力、膈肌肌细胞凋亡率及 p38 MAPK 蛋白表达水平。结果 B 组与 A 组相比,大鼠膈肌肌条收缩力明显下降,膈肌肌细胞凋亡率及 p38 MAPK 蛋白表达水平明显上升($P < 0.05$);C 组大鼠膈肌肌条收缩力、膈肌肌细胞凋亡率及 p38 MAPK 蛋白表达水平均明显恢复,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 乌司他丁可有效抑制脓毒症膈肌 p38 MAPK 信号通路的表达,并有效减少膈肌肌细胞凋亡率,降低脓毒症对膈肌造成的损伤。

关键词:乌司他丁;脓毒症;细胞凋亡;p38 MAPK;膈肌肌条收缩力;膈肌肌细胞凋亡率

中图分类号:R965;R565

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)09-0006-03

Effect of Ulinastatin on p38 MAPK Signaling Pathway in Diaphragmatic Muscle of Rats with Sepsis

Feng Qingzhou, Liu Xuan, Huang Jianxin

(Department of ICU, Shenzhen Seventh People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China 518081)

Abstract: Objective To study the effect of ulinastatin on p38 MAPK signaling pathway in diaphragmatic muscle of rats with sepsis. **Methods** Totally 60 SPF adult male Sprague-Dawley rats were selected and randomly divided into group A, group B and group C, 20 cases in each group. Group A was sham operation group, group B was sepsis group, and group C was ulinastatin treatment group. After anaesthesia, the abdomens of rats in group A were cut from the median line, and then the wound was sutured, the rat models of sepsis were established by cecal ligation puncture(CLP) model in group B, and the rats in group C were treated with ulinastatin immediately after operation. The rats in the 3 groups were executed within 16 h after operation. The contractility of the diaphragmatic muscle strips was observed, the apoptosis rate of diaphragm myocytes and the expression level of p38 MAPK protein were detected. **Results** Compared with group A, the contractility of diaphragmatic muscle strips was significantly decreased, while the apoptosis rate of diaphragm myocytes and the expression level of p38 MAPK protein in the right diaphragm were significantly increased in group B($P < 0.05$). The contractility of left diaphragmatic muscle strips, the apoptosis rate and the expression level of p38 MAPK protein in group C were significantly restored, and the difference was statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** Ulinastatin can effectively inhibit the expression of p38 MAPK signaling pathway in sepsis diaphragm, reduce the apoptosis rate of diaphragm myocytes and the damage of diaphragm caused by sepsis.

Key words: ulinastatin; sepsis; apoptosis; p38MAPK; contractility of diaphragm muscle; apoptosis rate of diaphragm myocytes

脓毒症是一种由重症感染引起的全身炎症反应综合征,持续发展可引起机体器官衰竭^[1]。研究显示,乌司他丁能有效抑制脓毒症膈肌 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路的表达^[2-3],但也有学者对此提出了质疑。本研究中拟用脂多糖(LPS)刺激巨噬细胞形成脓毒症,检测细胞上清液脂肪球表皮生长因子 8(MFG-E8)表达水平,并测定 p38 MAPK 的活性变化,以期阐明 LPS 刺激巨噬细胞后 MFG-E8 表达的规律。经 p38 MAPK 的特异性抑制剂 SB203580 干预后,检测细胞上

清液 MFG-E8 表达水平,并检测 p38 MAPK 的活性变化,比较 LPS 和 LPS + SB203580 刺激后巨噬细胞 MFG-E8 表达水平的变化及 p38 MAPK 活性变化,探讨脓毒症 MFG-E8 表达的规律及其分子机制,阐明 p38 MAPK 在脓毒症 MFG-E8 表达中的作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物与试药

动物:SPF 级成年雄性 SD 大鼠 60 只,由医学院实验动物中心提供,体质量为 250~300 g,合格证编号为

SCXK(浙)2003-0001号,动物饲料执行标准 GB14924-2001。饲养1周后观察其身体状态,判断其有无疾病或不良状态。试验前24 h内禁止饮食,不控制饮水。

试药:注射用乌司他丁(广东天普生化医药股份有限公司,国药准字 H19990134,批号为 20100406,规格为每支 10 万 U)2 000 U 腹腔注射。本研究所涉及技术均为成熟的试验技术,我院拥有本研究所需设备和条件,课题组人员配备合理,并掌握了细胞培养、RT-PCR 及 WESTERN-BLOT 等相关试验技术。

1.2 分组与建模

所有大鼠随机分为 A、B、C 3 组,各 20 只。A 组为假手术组,B 组为脓毒症组,C 组为乌司他丁治疗组。A 组取 10% 水合氯醛(0.35 mL/100 g)行腹腔麻醉,后将大鼠肢体固定,沿其下腹中心线正中剪开大鼠腹部,纵行切开长约 2 cm 切口,将其盲肠轻微拉出后纳入腹腔,不做任何处理后将切口缝合。B 组使用盲肠结扎穿刺(CLP)模型,将大鼠制成脓毒症动物模型,具体操作:麻醉后,将其左颈外动脉切开,留置导管,记录其平均动脉压、血压基础值等;采用手术分层的方式打开腹腔,找到盲肠后将其末端提起,在远端 2/3 盲肠部位以 1.0 丝线进行结扎,使用临床 18 号针对盲肠实施穿刺,2 次,孔 1 在大鼠盲肠末端,孔 2 在盲肠近端。轻压盲肠,使少量肠溶物流至腹腔内,然后将盲肠纳入腹腔,逐步缝合切口。术后,给予皮下注射林格液 50 mL/kg 体质量抗休克,观察其血压值变化,血压值下降幅度超过基础值 20% 且维持时间超过 20 min 以上,即认为达到早期脓毒性休克标准,完成试验模型的建立。C 组在制作 CLP 模型后,立即给予乌司他丁 2 000 U 腹腔注射,并于术后 8 h 再次注射。

1.3 膈肌肌条收缩力检测

术后 16 h 内处死大鼠,即刻剖腹取出左侧肋膈肌,包括中心腱和肋骨,并一同置通有 95% O₂ 与 5% CO₂ 混合气体的林格液浴槽中,保持 37.8 ℃。将膈肌剪成 5 mm × 15 mm 的肌条,使肌条肋骨段固定在浴槽底部,中心腱段与经过校准的张力转换器进行连接,张力转换器则连接对应生理记录仪。将肌条置 2 片铂金电极之间,采用刺激仪以 0.5 ms 单脉冲进行刺激,每次刺激间隔 2 h,且每次增加 0.05 mA,当得到的肌肉收缩力不再增加时获得最大收缩力数据。

1.4 膈肌肌细胞凋亡率检查

对新鲜膈肌组织使用 4% 多聚甲醛固定,连续切片,由石蜡包埋,使用原位细胞凋亡检查试剂盒(武汉博士德公司)TUNEL 法对膈肌细胞凋亡程度进行检测^[4-5]。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计学软件处理,计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行 *t* 检验;计数资料以百分比表示,行 χ^2 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本情况

A 组大鼠术后基本状态良好,行动自如,生命体征平稳,无特殊情况。腹腔内肠管正常或有少量粘连,肠黏膜正常或有轻度充血和水肿。B 组大鼠术后出现不同程度精神萎靡、行动迟缓、移动减少,并有部分大鼠存在不进食现象;腹腔内有极臭的血性或脓性渗出液,脏器内有充血、水肿等情况。B 组大鼠术后血压值下降幅度超过基础血压值的 20%,且持续 20 min 以上,A 组无下降现象。

2.2 检测指标

B 组大鼠膈肌肌条收缩较 A 组有明显下降,膈肌肌细胞凋亡率及 p38 MAPK 蛋白表达水平明显上升;C 组膈肌肌条收缩力较 A 组仍有明显下降,膈肌肌细胞凋亡率及 p38 MAPK 蛋白表达水平明显上升;C 组膈肌肌条收缩力、膈肌肌细胞凋亡率及 p38 MAPK 蛋白表达水平较 B 组均有明显改善,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。详见表 1。

表 1 3 组大鼠检测指标比较($\bar{X} \pm s, n = 20$)

组别	膈肌肌细胞 凋亡率(%)	p38 MAPK 蛋白表达 水平($\times 10^{-3}$)	膈肌肌条收缩力 ($\times 10^{-3}$, N/cm ²)
A 组	1.70 ± 1.35	10.20 ± 3.85	1 034.35 ± 34.25
B 组	25.10 ± 2.57*	149.34 ± 18.14*	167.94 ± 27.39*
C 组	14.40 ± 1.06**	93.41 ± 12.03**	300.50 ± 18.75**

注:与 A 组相比,**P* < 0.05;与 B 组相比,***P* < 0.05。

3 讨论

p38 MAPK 是 MAPKs 家族中的重要成员,在将信号从细胞表面转导进入细胞核的过程中具有重要作用^[6]。多种应激、前炎性细胞因子与生长因子均可激活 p38 MAPK,从而影响细胞的转录、蛋白合成和受体活化等生物效应。研究发现,在许多炎症反应中,如 LPS 处理的巨噬细胞、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 刺激的內皮细胞、白细胞介素 18(IL-18) 刺激的 U1 单核细胞株可观察到 p38 MAPK 磷酸化及活化^[7-8]。另有研究表明,TNF- α , IL-1, IL-6 的产生亦受 p38 MAPK 信号通路的调控,p38 MAPK 抑制剂对 TNF- α , IL-1, IL-6 等细胞因子的合成起抑制作用^[9-11]。可见,p38 MAPK 信号转导可导致多种致炎细胞因子的释放,反过来炎性介质也能激活 p38 MAPK,进而作用于 p38

MAPK 下游底物,从而形成一个逐级放大的炎症反应过程^[12-13]。因此,相关学者推测脓毒症时通过激活 p38 MAPK 信号转导通路,可进一步介导 MFG-E8 的表达调控。

本研究中,大鼠制作成 CLP 模型后膈肌收缩力明显下降,且 B 组只有 A 组的 20% 左右。膈肌作为机体的主要呼吸肌,一旦出现脓毒症造成膈肌收缩力下降,便会对机体呼吸功能造成影响,致使脓症患者无法长时间撤离呼吸机。因此,对于脓毒症膈肌损伤机制的研究及制订有效的防治措施具有重要意义^[14]。MAPK 信号通路是存在于大多数细胞内的一种重要信号系统,参与了细胞生长、发育、分化、凋亡等过程,脓毒症膈肌 p38 信号通路则是 MAPK 的一种,处于应激诱导信号,该信号通道促进凋亡的机制是机体内毒素激活 p38 MAPK 信号后,进一步诱使凋亡激活转录因子-2 酸化,促使 DNA 断裂,最终使细胞发生肥大和凋亡。本研究中指出,随着 p38 MAPK 蛋白表达的增加,膈肌肌细胞凋亡率也明显增加,膈肌肌条收缩力下降。乌司他丁则是在人体尿液中发现的尿胰蛋白酶抑制剂,能广谱、高效移植多种蛋白酶、酯水解酶,并有效刺激炎症因子的释放。脓毒症时肠道菌群失调及细菌移位,是导致多器官功能障碍综合征(MODs)的“始动器”,肠道作为体内最大的“免疫器官”“储菌库”“内毒素库”,参与了 MODs 的病理生理过程。MFG-E8 在肠黏膜损伤后修复和肠道炎症调节中亦起了重要作用;p38 MAPK 信号转导可导致多种致炎细胞因子的释放,反过来炎症介质也能激活 p38 MAPK,因此 MFG-E8 参与脓毒症的发生、发展及 p38 MAPK 信号转导通路介导 MFG-E8 的表达调控在理论上可行^[15-16]。本研究结果显示,C 组细胞凋亡率大于 A 组,小于 B 组;p38 MAPK 蛋白表达水平大于 A 组,小于 B 组;膈肌肌条收缩力小于 A 组,大于 B 组。证实乌司他丁治疗脓毒症后,膈肌肌条收缩力、膈肌肌细胞凋亡率及 p38 MAPK 蛋白表达水平均有明显改善,且对 p38 MAPK 信号通路的表达有重要影响。

综上所述,乌司他丁可有效抑制脓毒症膈肌 p38 MAPK 信号通路的表达,并有效减少膈肌肌细胞凋亡率,降低脓毒症对膈肌造成的损伤,对于治疗脓毒症有重要意义。

参考文献:

- [1] 张红梅,刘 培,盛春风,等. 乌司他丁对脓毒症膈肌 p38 MAPK 信号通路的影响[J]. 重庆医学,2013,42(18): 2117-2119.
- [2] 张利鹏,赵 焱,刘国娟,等. 乌司他丁通过干预 p38 MAPK/ERK

信号通路减轻脓毒症性肺损伤[J]. 中国药理学通报,2016,32(9): 1311-1316.

- [3] 周 丽,徐洪山,王齐国,等. 乌司他丁联合常规集束化干预对重症脓毒症的影响[J]. 中国医药导报,2017,14(11): 119-123.
- [4] 徐 巍. 乌司他丁对脓毒症患者临床治疗分析[J]. 浙江创伤外科,2014,19(1): 133-135.
- [5] 杜 娜,鲍万国,张凯宇,等. 乌司他丁治疗脓毒性休克临床疗效观察[J]. 中国药业,2013,22(z1): 79.
- [6] Keita AV, Söderholm JD. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors[J]. Neurogastroenterol Motil, 2010, 22(7): 718-733.
- [7] Bondarenko VM, Riabickienko EV. Intestinal-brain axis. Neuronal and immune-inflammatory mechanisms of brain and intestine pathology[J]. Zh Mikrobiol Immunobiol, 2013(2): 112-120.
- [8] Jiang L, Yang L, Zhang M, et al. Beneficial effects of ulinastatin on gut barrier function in sepsis[J]. Indian J Med Res, 2013, 138(6): 904-911.
- [9] Coldewey SM, Rogazzo M, Collino M, et al. Inhibition of IκB kinase reduces the multiple organ dysfunction caused by sepsis in the mouse[J]. Dis Model Mech, 2013, 6(4): 1031-1042.
- [10] Hasan Z, Palani K, Zhang S, et al. Rho kinase regulates induction of T-cell immune dysfunction in abdominal sepsis[J]. Infect Immun, 2013, 81(7): 2499-2506.
- [11] Fredenburgh LE, Velandia MM, Ma J, et al. Cyclooxygenase-2 deficiency leads to intestinal barrier dysfunction and increased mortality during polymicrobial sepsis[J]. J Immunol, 2011, 187(10): 5255-5267.
- [12] Chatterton DE, Nguyen DN, Bering SB, et al. Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(8): 1730-1747.
- [13] Kusunoki R, Ishihara S, Aziz M, et al. Roles of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in intestinal inflammation[J]. Digestion, 2012, 85(2): 103-107.
- [14] Otani A, Ishihara S, Aziz MM, et al. Intrarectal administration of milk fat of globule epidermal growth factor-8 protein ameliorates murine experimental colitis[J]. Int J Mol Med, 2012, 29(3): 349-356.
- [15] Xu Jie, Song YH, Ma MY, et al. Effects of ulinastatin combined with rhubarb on myocardial injury in severe sepsis[J]. Chinese Journal of integrated traditional Chinese and Western Medicine, 2012, 19(3): 159-161.
- [16] Hao XJ, Cai GL, Chen J, et al. Progress of research on the protective mechanism of ulinastatin on endothelial cells of sepsis[J]. Prevention and Treatment of Cardio-Cerebrovascular Disease, 2015, 21: 486-488.

(收稿日期:2017-11-28;修回日期:2018-01-04)