

己酮可可碱弱化大鼠脓毒症急性肺损伤对 p38MAPK/I κ B α 磷酸化的影响

崔修德^{1,2}, 封光³, 张稳稳³, 刘功俭^{3*} (1.河南省焦作市第二人民医院麻醉科, 河南 焦作 454000; 2.江苏省麻醉学重点实验室, 江苏 徐州 221002; 3.徐州医学院附属医院麻醉科, 江苏 徐州 221002)

摘要: 目的 探讨己酮可可碱(pentoxifylline, PTX)对腹腔感染致脓毒症急性肺损伤发挥保护作用的上游信号机制。方法 采用盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)致脓毒症模型, 将大鼠随机分为假手术组、脓毒症组、脓毒症+西黄蓍胶组、脓毒症+生理盐水组、脓毒症+SB203580 组、脓毒症+PTX 组。检测假手术组、脓毒症组各时间点(1, 3, 6, 12, 24 h)p38MAPK 及 I κ B α 的磷酸化, 然后选择 1, 6, 24 h 组分别检测应用 SB203580 或 PTX 后 p38MAPK 及 I κ B α 的表达, 同时检测血浆 TNF- α 、IL-6 的含量并观察 24 h 组肺组织病理改变。结果 与假手术组比较, 脓毒症组在各个时间点 p38MAPK 及 I κ B α 均有较强的表达, SB203580 或 PTX 预处理后各组的 p38MAPK 及 I κ B α 的磷酸化明显受到抑制, 且与血浆 TNF- α 、IL-6 的含量以及肺的病理切片变化一致。结论 PTX 对脓毒症急性肺损伤的保护作用以及抑制促炎因子产生的作用可能是通过抑制 p38MAPK 的磷酸化从而抑制 NF- κ B 的活化而产生的。

关键词: 脓毒症; 急性肺损伤; 己酮可可碱; p38MAPK; NF- κ B

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)05-0412-04

Effects of Pentoxifylline Attenuates Septic Acute Lung Injury Induced by Cecal Ligation and Puncture on the Phosphorylation of p38 Mitogen Activated Protein Kinase and I κ B α

CUI Xiude^{1,2}, FENG Guang³, ZHANG Wenwen³, LIU Gongjian^{3*} (1.Department of Anesthesia, Jiaozuo Second People Hospital, Jiaozuo 454000, China; 2.Jiangsu Province Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou 221002, China; 3.Department of Anesthesia, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the upstream signal transduction mechanism of pentoxifylline(PTX) on acute lung injury (ALI) in rats sepsis induced by intra-abdominal infection. **METHODS** SD rats were subjected to sepsis caused by cecal ligation and puncture(CLP), animals were randomly divided into sham operation group, sepsis group, sepsis+tragacanth group, sepsis+normal saline group, sepsis+SB203580 group, sepsis+PTX group. p38MAPK and I κ B α phosphorylation were measured in 1, 3, 6, 12, 24 h respectively. And 1, 6, 24 h after pretreated with SB203580 or PTX, p38MAPK and I κ B α phosphorylation, the concentration of plasma TNF- α , IL-6 were examined and the pulmonary histopathology after induced 24 h were determined. **RESULTS** Compared with sham operation group, p38MAPK and I κ B α became phosphorylated and hence activated in sepsis group. Pretreated with both p38MAPK and I κ B α were inhibited, consistent with the change of the concentration of plasma TNF- α , IL-6 and the pulmonary histopathology. **CONCLUSION** These results suggest that the inhibitory activity of pentoxifylline on the production of proinflammatory mediators and the pulmonary protection seems to be mediated via inhibition of p38MAPK and then suppression the activation of NF- κ B in polymicrobial sepsis-induced ALI.

KEY WORDS: sepsis; acute lung injury; pentoxifylline; p38MAPK; NF- κ B

脓毒症(sepsis)是由包括革兰阴性菌在内的多种感染所引起的一种全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),它是急性肺损伤(acute lung injury, ALI)/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的主要病因之一^[1],是机体过度生成细胞因子、化学介质、黏附分子、活性脂质产物的病理状态^[2]。己酮可可碱(pentoxifylline,

PTX)为甲基黄嘌呤衍生物、非选择性磷酸二酯酶抑制药。研究表明 PTX 衰减脓毒症上调表达的 TNF- α , IL- β , IL-6 而维持血管肾上腺髓质的反应性,稳定多种微生物感染脓毒症恶化的血液动力学,改善心血管功能^[3];通过降低肺组织内皮和上皮细胞间黏附分子的表达和调节 TNF- α , IL-6 及 IL-8, PTX 对脓毒症引起的急性肺损伤起

作者简介: 崔修德,男,硕士,主治医师 Tel:13619859691 E-mail: cuixiude000@163.com
主任医师,硕导 Tel: 13952203528 E-mail: liugongjian61@hotmail.com

*通信作者: 刘功俭,男,博士,教授,

保护作用^[4],而且此保护作用是通过抑制 NF- κ B 的活化而产生的^[5]。NF- κ B 参与了脓毒症肺损伤多种病理生理过程,但 PTX 作用于 NF- κ B 上游信号机制仍不清楚。前期的研究表明 PTX 通过抑制 p38MAPK 的磷酸化抑制促炎因子的过度表达,发挥对脓毒症急性肺损伤的保护作用^[6]。本试验采用盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)致脓毒症肺损伤模型对 PTX 肺保护作用与 NF- κ B 和 p38MAPK 活化的关系作进一步探讨。

1 材料和方法

1.1 试剂

己酮可可碱(美国 Sigma 公司,批号:200709014);抗 p38、p-p38 抗体及抗 I κ B α 、p-I κ B α 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);TNF- α 和 IL-6 试剂盒(美国 R&D 公司);SB203580(p38 MAPK 抑制剂,美国 Santa 公司,批号:20071120)。

1.2 动物模型制备^[6]

清洁级 SD 大鼠,♂,285~325 g,购自中国科学院上海实验动物中心,动物合格证号:SCXK(苏)2005-0005。动物饲养在温度控制的环境,术前禁食不禁饮 12 h。手术均在每日上午进行,10%水合氯醛(350 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉后,固定、铺无菌孔巾,沿腹正中线作 1 cm 切口,暴露盲肠,在回盲瓣下结扎盲肠的 1/4,以免肠梗阻。用 21 号针穿通盲肠两次,并留置一根宽 1 mm 的橡皮引流条贯通盲肠以免针孔闭合,还纳盲肠后逐层关腹,术中严格注意无菌操作。手术结束立即皮下注射林格氏液 50 mL·kg⁻¹ 抗休克,术后动物随意饮水、进食。该模型动物 72 h 死亡率为 70%。

1.3 分组

动物随机分为假手术组(Sham 组)、脓毒症组(CLP 组),根据取材的时间点不同分为 1, 3, 6, 12, 24 h 5 个亚组,每组各 6 只、脓毒症加西黄著胶组(CLP+V 组)、脓毒症+生理盐水组(CLP+N 组)、脓毒症+SB 组(CLP+SB203580 组)、脓毒症+己酮可可碱组(CLP+PTX 组);其中 CLP+V 组、CLP+N 组为溶媒对照组,CLP+V 组、CLP+N 组、CLP+SB 组、CLP+PTX 组按取材时间点不同又分为 1, 6, 24 h 3 个亚组,每组各 6 只。Sham 组只翻动盲肠,不作结扎和穿刺;CLP+SB 组术前予以 SB203580(10 mg·kg⁻¹)灌胃、12 h 一次、最多两次;CLP+V 组为 CLP+SB 组的对照组,给予等容积溶

媒西黄著胶,CLP+PTX 组术前开始腹腔注射给予 PTX(10 mg·kg⁻¹)每小时 1 次,最多 5 次;CLP+N 组为 CLP+PTX 组的对照组,给予等容积生理盐水腹腔注射。各组动物在各个时间点麻醉后断头处死,取肺组织和左心房血用于检测。

1.4 检测指标和方法^[6]

1.4.1 Western Blot 法分析蛋白含量 采集左肺上叶贮存于液氮至匀浆时。样本用玻璃匀浆器于冰上匀浆。然后在 4℃ 条件下 49 506 r·min⁻¹ 离心 15 min,上清用于检测胞浆蛋白。蛋白含量测定按改良 Lowry 法,以牛血清白蛋白作为标准蛋白。等量蛋白样品经 10%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,以半干转法电转移至 NC 膜上,转移缓冲液为 25 mmol·L⁻¹ Tris,192 mmol·L⁻¹ 甘氨酸,20% 甲醇,pH 8.3,转移条件为稳流:电流(A)=膜面积(cm²)×2,时间为 40 min。转移以后的 NC 膜 4℃ 封闭过夜后用 TBST 液洗 3 遍后,与 1:1 000 稀释的一抗 p38、p-p38(Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²-磷酸化 p38MAPK)、I κ B α 和 p-I κ B α (Ser³² 磷酸化 I κ B α)4℃ 孵育过夜,洗膜 3 遍后室温下与酶标二抗反应 2 h,再洗膜 3 遍后以 NBT/BCIP 显色,水洗终止反应。利用 ImageJ 软件分析其灰度值(OD 值),计算出各组 OD 值与 Sham 组 OD 值的比值。

1.4.2 酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆中 TNF- α 和 IL-6 左心血液样本经肝素抗凝在 4℃ 20 785 r·min⁻¹ 离心 15 min,然后贮存在-80℃ 冰箱。采用 ELISA 试剂盒严格按说明书进行操作,在波长 450 nm 处测 OD 值。以 OD 值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线,根据血浆样品的 OD 值在标准曲线上查出其浓度。最低可检测浓度为 1.0 pg·mL⁻¹。

1.4.3 肺组织病理检查 大鼠手术后 24 h 取右肺尾叶固定于 10%甲醛(福尔马林)溶液中过夜,取出后脱水、石蜡包埋,切片(6 mm),HE 染色后光镜观察病理改变。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用 q 检验 SNK 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织中 p38MAPK 和 I κ B α 的磷酸化和活化 脓毒症组 p38MAPK 和 I κ B α 的活化有着基本

相同的趋势：与 Sham 组比，各时间点 p38MAPK 均有明显的磷酸化，1 h 时即有明显的表达，从 3 h 开始持续活化至 24 h，结果与前期报道^[6]一致；各时点 I κ B α 均有明显的磷酸化，1 h 时即有明显的表达，从 6 h 开始持续活化至 24 h，见图 1。

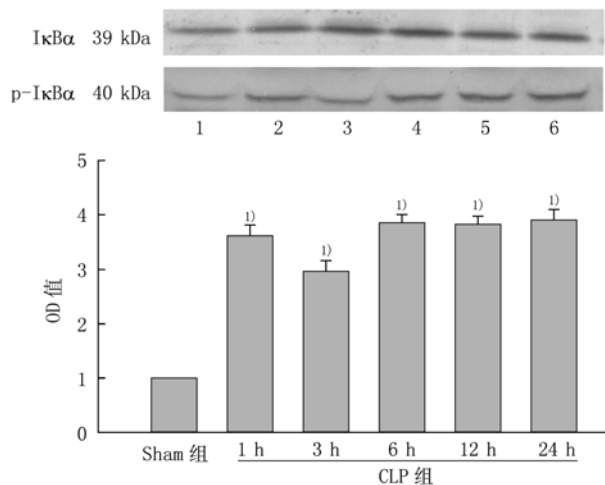


图 1 CLP 诱导后不同时间点肺组织 I κ B α 磷酸化和活化 ($\bar{x} \pm s$)

1-Sham 组；2-CLP 1 h 组；3-CLP 3 h 组；4-CLP 6 h 组；5-CLP 12 h 组；6-CLP 24 h 组；与 Sham 组相比，¹⁾ $P < 0.05$

Fig 1 Time course of I κ B α phosphorylation and activation in lung tissue of after CLP induction ($\bar{x} \pm s$)

1-Sham group; 2-CLP 1 h group; 3-CLP 3 h group; 4-CLP 6 h group; 5-CLP 12 h group; 6-CLP 24 h group; compared with Sham group, ¹⁾ $P < 0.05$

2.2 血浆中 TNF- α 和 IL-6 的表达

为更好的反应 p38MAPK 和 I κ B α 磷酸化的趋势和整体性及相对应的血浆 TNF- α 和 IL-6 变化趋势选择 1, 6, 24 h 3 个时间点利用 ELISA 法检测血浆中 TNF- α 和 IL-6 的相对水平。Sham 组浓度较低但能检测到，但脓毒症组诱导后 6, 24 h 血浆 TNF- α 和 IL-6 的水平明显升高，而 SB203580 和 PTX 预处理均能持续的抑制两者的表达。这与前期报道^[6]结果相似。

2.3 SB203580 和 PTX 预处理对 CLP 诱导的 p38MAPK 活化的效应

上述结果已表明 CLP 可以激活 p38MAPK，因而观察 PTX 对其抑制效应，并与 p38 的特异抑制剂 SB203580 做一比较，同时为排除溶媒的影响，与溶媒对照组比较。PTX 预处理可明显抑制 CLP 诱导的 p38MAPK 的磷酸化，效应与 SB203580 相似。

2.4 SB203580 和 PTX 预处理对 CLP 诱导的 I κ B α 活化的效应

为证实肺组织中 NF- κ B 是 PTX 作用的靶点并进一步了解其介导调节 NF- κ B 活化的机制，用 Western Blot 法分析 PTX 对 I κ B α 的磷酸化效应。同时观察 p38 的特异抑制剂对 I κ B α 活化的影响，并与溶媒对照组比较。结果见图 2。SB203580 和 PTX 在每个观察的时间点均明显抑制 I κ B α 活化，提示 p38 的磷酸化在 CLP 诱导的 I κ B α 活化的过程中起着重要作用。

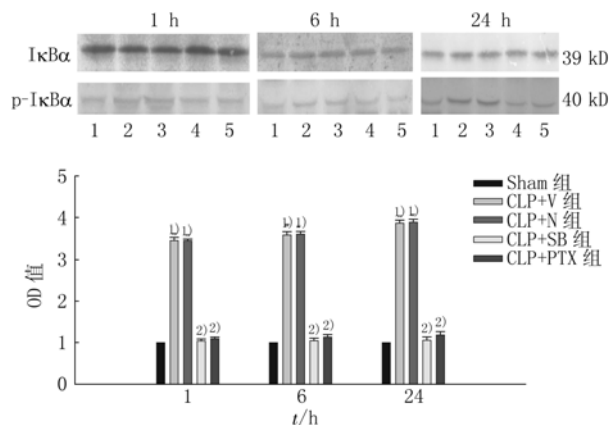


图 2 SB203580 或 PTX 预处理对 CLP 诱导后 1, 6, 24 h 肺组织 I κ B α 活化的效应 ($\bar{x} \pm s$)

1-Sham 组；2-CLP+V 组；3-CLP+N 组；4-CLP+SB 组；5-CLP+PTX 组；与 Sham 组比较，¹⁾ $P < 0.05$ ；与 CLP+N 组比较，²⁾ $P < 0.05$

Fig 2 Effects of pretreating with SB203580 and PTX on the CLP-induced activation of I κ B α in lung tissue after CLP-induced 1, 6, 24 h ($\bar{x} \pm s$)

1-Sham group; 2-CLP+V group; 3-CLP+N group; 4-CLP+SB group; 5-CLP+PTX group; Compared with Sham group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with CLP+N group, ²⁾ $P < 0.05$

2.5 肺损伤及 SB203580 和 PTX 预处理的保护效应

形态学检查显示出 Sham 组正常的微观结构，CLP 诱导导致肺组织广泛间质性水肿、毛细血管充血、大面积坏死、多形核白细胞的渗漏等特征性病理变化，而 SB203580 或 PTX 预处理几乎完全保护肺组织免于 CLP 诱导引起的肺损伤。与在体实验保护的结果一致，其保护效应明显降低了血浆中升高的 TNF- α 和 IL-6 的水平。病理切片结果与前期报道^[6]相似。

3 讨论

脓毒症时涉及激酶、转录因子和免疫调节介质的多种细胞内信号转导通路的改变。细胞内广泛存在和高度保守的丝裂原活化蛋白激酶家族 (MAPKs) 对应激和微生物感染发生应答反应^[7]，特

别是 p38MAPK 能被脓毒症显著的诱导^[8]。临床上脓毒症诱发的 ALI 病例, 早期 p38MAPK 活化的提高与病人严重的预后密切相关^[9], 而抑制 p38MAPK 的活性可以改善病人的预后^[10]。NF- κ B 是细胞内普遍存在的重要转录因子, 是多条信号转导途径的交汇点, 广泛参与了机体免疫、炎症、应激反应等生理及病理过程^[11]。对 CLP 诱导的脓毒症 ALI 的动物模型的研究表明抑制 NF- κ B 的活性可以降低动物的死亡率^[12-13]。因 I κ B α 磷酸化导致了 I κ B α 的泛素化和降解以及后继的 NF- κ B 核转位, 是活化 NF- κ B 的必要条件, 故本试验以 I κ B α Ser³² 的磷酸化作为 NF- κ B 活化的标志^[14]。本试验结果表明: CLP 诱导了 p38MAPK 和 I κ B α 持续而时间依赖性的活化。特别是诱导后 1 h 两者均明显的磷酸化, 推测这个时间点的活化最有可能是手术应激触发的^[15]。此后在各个观察时间点两者均明显的磷酸化而激活, 且与血浆中 TNF- α 和 IL-6 表达相一致。使用 p38MAPK 的特异性抑制剂 SB203580 阻断 p38MAPK 的磷酸化能明显减少 TNF- α 和 IL-6 的产生并改善肺部的病理改变, 能清晰地评价和说明 p38MAPK 在 CLP 诱导的脓毒症肺损伤病理过程中的作用。

此次研究进而探讨了 p38MAPK 激活后的下游机制。I κ B α 的磷酸化及活化整体上与 p38MAPK 的磷酸化平行, 而且 SB203580 可以抑制 CLP 诱导的各个时间点 I κ B α 的磷酸化, 这些结果提示在 CLP 诱导的脓毒症肺损伤的病理过程中, p38MAPK 信号通路激活涉及了 NF- κ B 活化。

当然, PTX 抑制 p38MAPK 的机制是复杂的。PTX 抑制磷酸二酯酶家族(phosphodiesterase, PDEs)特别是 PDE₄ 提高了细胞内环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)的水平。新近的体外实验用脂多糖(LPS)处理人单核细胞的研究表明 PTX 能明显降低胞浆 I κ B α 、核内 p65 的磷酸化、NF- κ B 的 DNA 结合力而抑制转录因子的活化进而抑制促炎因子的表达, 且不依赖蛋白激酶 A(PKA)^[16]。因此, CLP 诱导的脓毒症 ALI 模型中, cAMP 和 cGMP 对 p38 MAPK 磷酸化和 NF- κ B 活化的详尽机制及相互关联有待于进一步阐明。

总之, 在 CLP 诱导的大鼠脓毒症 ALI 模型中, PTX 介导的 p38 MAPK 的失活然后抑制 NF- κ B 的

活化可能是 PTX 抑制促炎因子 TNF- α 和 IL-6 的过度表达, 改善肺部病理改变, 产生肺保护作用的机制。

REFERENCES

- [1] BERSTEN A D, EDIBAM C, HUNT T, et al. Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian states [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165(5): 443-451.
- [2] ULLOA L, TRACEY K J. The 'cytokine profile': a code for sepsis. *Trends [J]. Mol Med*, 2005, 11(1): 56-63.
- [3] KOO D J, YOO P, CIOFFI W G, et al. Mechanism of the beneficial effects of pentoxifylline during sepsis: maintenance of adrenomedullin responsiveness and downregulation of proinflammatory cytokines [J]. *J Surg Res*, 2000, 91(1): 70-76.
- [4] MICHETTI C, COIMBRA R, HOYT D B, et al. Pentoxifylline reduces acute lung injury in chronic endotoxemia [J]. *J Surg Res*, 2003, 115(1): 92-99.
- [5] HAN S J, KO H M, CHOI J H, et al. Molecular mechanisms for lipopolysaccharide-induced biphasic activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(12): 44715-44721.
- [6] CUI X D, FENG G, ZHANG W W, et al. Effect of pentoxifylline on the activation of p38 mitogen activated protein kinase in rats with septic acute lung injury [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2010, 27(9): 767-771.
- [7] KUMAR S, BOEHM J, LEE J C. p38MAP kinases: Key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(6): 717-726.
- [8] GUHA M, MACKMAN N. LPS induction of gene expression in human monocytes [J]. *Cell Signal*, 2001, 13(2): 85-94.
- [9] ABRAHAM E. Alterations in cell signaling in sepsis [J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 15(Suppl 7): S459-464.
- [10] ASADUZZAMAN M, WANG Y, THORLACIUS H. Critical role of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in septic lung injury [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(2): 482-488.
- [11] SUN ZW, ANDERSSON R. NF- κ B activation and inhibition: a review [J]. *Shock*, 2002, 18(8): 99-111.
- [12] SHEEHAN M, WONG H, HAKE PW, et al. Parthenolide improves systemic hemodynamics and decreases tissue leukosequestration in rats with polymicrobial sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31(12): 2263-2270.
- [13] IKEZOE T, YANG Y, HEBER D, et al. PC-SPES: a potent inhibitor of nuclear factor-kappa B rescues mice from lipopolysaccharide-induced septic shock [J]. *Mol Pharmacol*, 2003, 64(12): 1521-1529.
- [14] GIUSEPPE M, ANGELINA M, CONCETTA B. Mitogen-activated protein kinases and NF- κ B are involved in TNF- α responses to group B streptococci [J]. *J Immunol*, 2002, 169(3): 1401-1409.
- [15] OBATA T, BROWN G E, YAFFE M B. MAP kinase pathways activated by stress: the p38MAPK pathway [J]. *Crit Care Med*, 2000, 28(Suppl 4): N67-77.
- [16] DEREJ J, MARTINS J O, MELBOSTAD H, et al. Insights into the regulation of TNF- α production in human mononuclear cells: the effects of non-specific phosphodiesterase inhibition [J]. *Clinics*, 2008, 63(4): 321-328.

收稿日期: 2010-06-21