

己酮可可碱对大鼠脓毒症急性肺损伤 p38MAPK 活性的影响

崔修德¹, 封光², 张稳稳², 刘功俭^{2*} (1.河南省焦作市第二人民医院麻醉科, 河南 焦作 454001; 2.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肺保护作用与 p38MAPK 活化的关系。方法 采用盲肠结扎穿孔致脓毒症模型, 将大鼠随机分为 I 组(Sham 组)、II 组(脓毒症 CLP 组)、III 组(脓毒症加西黄蓍胶 CLP+V 组)、IV 组(脓毒症加生理盐水 CLP+N 组)、V 组(脓毒症加 SB203580 CLP+SB 组)、VI 组(脓毒症加己酮可可碱 CLP+PTX 组), 其中 III 组、IV 组为溶媒对照组。用 Western Blot 检测假手术组, 脓毒症 1, 3, 6, 12, 24 h 后 p38MAPK 的磷酸化, 然后选择 1, 6, 24 h 分别检测应用 SB203580 或 PTX 后 p38MAPK 的表达, 同时检测血浆 TNF- α 、IL-6 的含量并观察 24 h 内肺组织病理改变。结果 与假手术组比较, 脓毒症组在各个时间点 p38MAPK 均有较强的表达, SB203580 或 PTX 预处理后各组的 p38MAPK 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 己酮可可碱可能是通过抑制 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。

关键词: 脓毒症; 急性肺损伤; 己酮可可碱; p38MAPK

中图分类号: R962.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)09-0767-05

Effect of Pentoxifylline on the Activation of p38 Mitogen Activated Protein Kinase in Rats with Septic Acute Lung Injury

CUI Xiude¹, FENG Guang², ZHANG Wenwen², LIU Gongjian^{2*} (1.Department of Anesthesia, Jiaozuo Second People's Hospital, Jiaozuo 454000, China; 2.Department of Anesthesia, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect of pentoxifylline (PTX) on the activation of p38MAPK in rats with septic acute lung injury induced by intra-abdominal infection. **METHODS** SD rats were subjected to sepsis caused by cecal ligation and puncture (CLP), and animals were randomly divided into I group (sham operation group), II group (sepsis CLP group), III group (sepsis+tragacanth CLP+V group), IV group (sepsis+NS CLP+N group), V group (sepsis+SB203580 CLP+SB group), VI group (sepsis+PTX CLP+PTX group). p38MAPK phosphorylation were measured in 1, 3, 6, 12, 24 h, respectively. 1, 6, 24 h after pretreated with SB203580 or PTX, p38MAPK phosphorylation, the concentration of plasma TNF- α , IL-6, and the pulmonary histopathology were determined. **RESULTS** Compared with sham operation, p38MAPK became phosphorylated and hence activated in sepsis group. Pretreated with SB203580 or PTX, p38MAPK were inhibited, consistent with the change of the concentration of plasma TNF- α , IL-6, and the pulmonary histopathology. **CONCLUSION** The result suggests that PTX

作者简介: 崔修德, 男, 硕士, 副主任医师 Tel: 13619859691 E-mail: cuixiude000@163.com *通信作者: 刘功俭, 男, 博士, 教授, 硕导 Tel: 13952203528 E-mail: liugongjian61@hotmail.com

may alleviate the inflammatory reaction and produce the pulmonary protection in rats polymicrobial sepsis-induced ALI by inhibiting p38MAPK activation.

KEY WORDS: sepsis; acute lung injury; pentoxifylline; p38MAPK

脓毒症为合并感染的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),是机体的过度炎症反应或炎症失控所致^[1],也是引起急性肺损伤(acute lung injury, ALI)最常见的原因,易并发多器官功能失常综合征(MODS)。虽然近年来重症监护治疗取得了长足进展,但发病率和死亡率仍然居高不下^[2-3]。研究表明己酮可可碱(pentoxifylline, PTX)对脓毒症所致的ALI具有良好的保护作用,且已明确己酮可可碱通过抑制促炎因子如TNF- α 、IL-6等的生成而发挥肺保护作用^[4],但其上游的分子转导机制尚不清晰。研究表明p38 MAPK 广泛参与了脓毒症诱导急性肺损伤的病理生理过程,因此,本试验采用盲肠结扎和针刺(cecal ligation and puncture, CLP)致脓毒症ALI模型,观察PTX预处理的肺保护作用对p38MAPK活性的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

己酮可可碱(PTX, 美国Sigam公司, 批号: 20070914); p38、p-p38抗体(美国Cell Signaling Technology公司, 批号: 20080128); TNF- α 和IL-6试剂盒购自美国R&D公司。

1.2 动物模型制备

清洁级 δ , SD 大鼠, 285~325 g(中国科学院上海实验动物中心, 实验动物合格证号: SCXKC〈苏〉2005-0005)。参照 Chaudry 等 CLP 法^[5-6]制备脓毒症动物模型。具体方法如下: 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 mg·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

动物随机分为随机分为 I 组(Sham组)、II 组(脓毒症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)、III组(脓毒症加西黄蓍胶CLP+V组)、IV组(脓毒症加生理盐水CLP+N组)、V组(脓毒症加SB203580 CLP+SB组)、VI组(脓毒症加己酮可可碱CLP+PTX组), 其中III组、IV组为溶媒对照组, III组、IV组、V组、VI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。I 组只翻动盲肠, 不作结扎和穿刺; V 组术前予以p38MAPK的特异抑制剂SB203580 [4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole](10 mg·kg⁻¹)灌胃、每隔12 h 灌胃1次、最多2次; III组为V组的对照组, 给予等体积溶媒西黄蓍胶, VI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; IV组为VI组的对照, 给予等体积生理盐水腹腔注射。各组动物在麻醉后断头处死, 取肺组织和左心房血用于检测。

1.4 检测指标和方法

1.4.1 Western Blot分析蛋白含量 采集左肺上叶贮存于液氮至匀浆时。匀浆液配方如下: 含10 mmol·L⁻¹ HEPES, pH 7.9, 0.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol·L⁻¹ KCl, 0.1 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.1 mmol·L⁻¹ EGTA, 50 mmol·L⁻¹ NaF, 1 mmol·L⁻¹ DTT, 30 mmol·L⁻¹ β -phosphoglycerol, 1 mmol·L⁻¹ Na₃VO₄, 1 mmol·L⁻¹ 苯甲脒, 酶抑制剂: 0.5 mmol·L⁻¹ PMSF, 10 μ g·mL⁻¹ 抑肽酶, 10 μ g·mL⁻¹ 亮抑酶肽, 10 μ g·mL⁻¹ 抑胃肽A和1 μ g·mL⁻¹ PNPP, 样本用玻璃匀浆器于冰上匀浆。然后在4 $^{\circ}$ C, 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(SDS-PAGE)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, pH8.3, 转移条件为稳流: 电流(A)=膜面积(cm²) $\times$ 2, 时间为40 min。转移以后的NC膜4 $^{\circ}$ C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-phosphorylated p38 MAPK) 4 $^{\circ}$ C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Image J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℃冰箱至检测时。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的磷酸化和活化

CLP诱导了肺组织p38MAPK持续而时间依赖性的活化, 1 h时即有明显的表达, 从3 h开始持续活化至所观察的时间点。与Sham组相比, CLP组p38MAPK在各个时间点均明显磷酸化, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 特别是诱导后1 h即明显的磷酸化, 见图1。

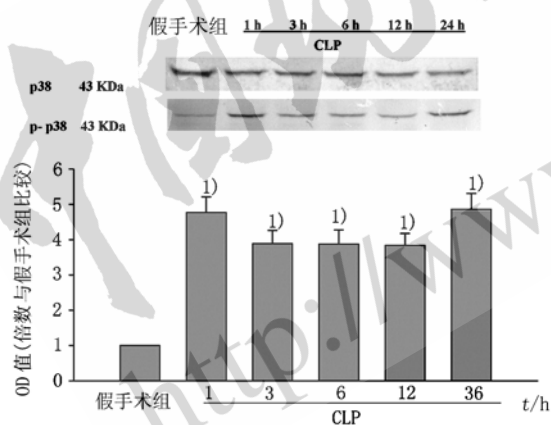


图1 CLP诱导后不同时间点肺组织p38MAPK磷酸化和活化。

注: 与假手术组相比, ¹⁾ $P < 0.05$

Fig 1 Time course of p38MAPK phosphorylation and activation in lung tissue of after CLP induction

Note: Compared with Sham group, ¹⁾ $P < 0.05$

2.2 血浆中TNF- α 和IL-6的表达

根据采用Western blot方法测得肺组织中

p38MAPK磷酸化和活化的结果, 同时为更好的反应p38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其3个时间点利用ELISA法检测血浆中TNF- α 和IL-6, 6的相对浓度。假手术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。结果见图2和图3。

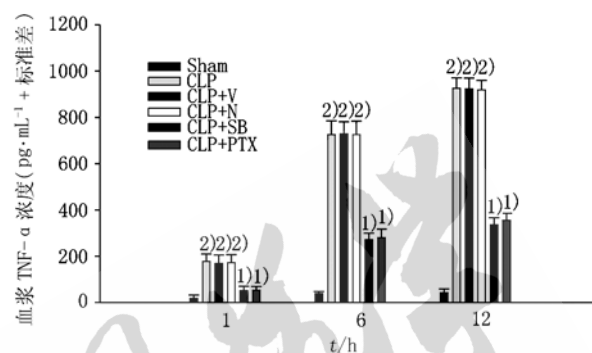


图2 血浆TNF- α 的浓度

注: 与溶媒组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与假手术组相比, ²⁾ $P < 0.05$

Fig 2 Expression of TNF- α in plasma

Note: Compared with vehicle-treated group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with sham, ²⁾ $P < 0.05$

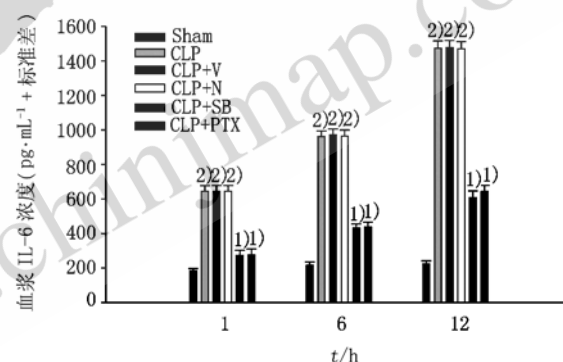


图3 血浆IL-6的浓度

注: 与溶媒组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与假手术组相比, ²⁾ $P < 0.05$

Fig 3 Expression of IL-6 in plasma

Note: Compared with vehicle-treated group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with sham, ²⁾ $P < 0.05$

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, 加做溶媒对照组。如图4所示, PTX预处理可明显抑制CLP诱导的p38MAPK的磷酸化, 效应与SB203580相似。

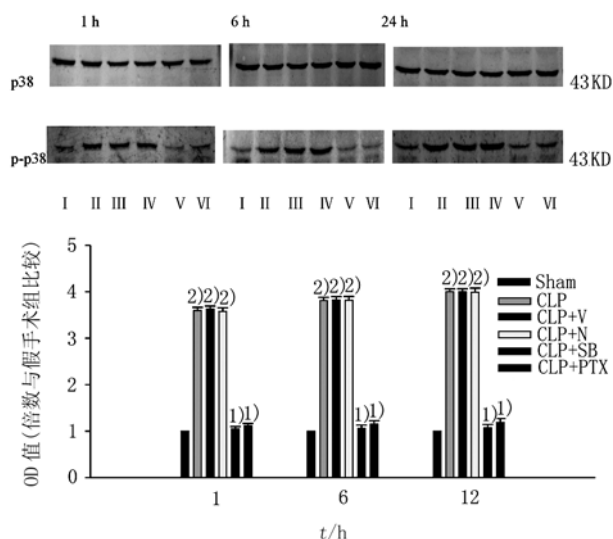


图4 SB203580和PTX对CLP诱导的肺组织p38MAPK活化的效应。

注：与溶媒组相比，¹⁾ $P < 0.05$ ；与假手术组相比，²⁾ $P < 0.05$

Fig 4 Effects of SB203580 and pentoxifylline on the CLP-induced activation of p38 MAPK in lung tissue.

Note: Compared with vehicle-treated group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with sham, ²⁾ $P < 0.05$

2.4 肺损伤及SB203580和PTX预处理的保护效应
形态学检查显示出假手术组正常的微观结构，见图5A，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，见图5B，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，见图5E和图5F。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。

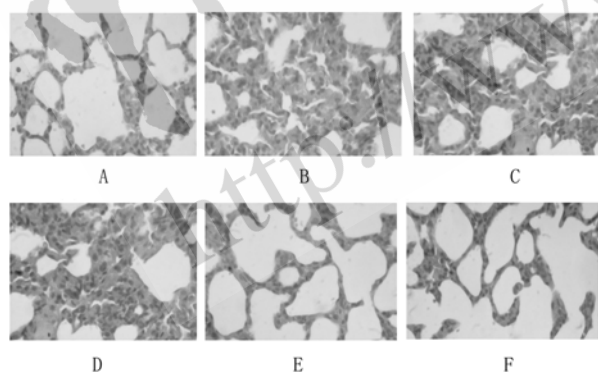


图5 肺损伤及SB203580和PTX预处理的肺部病理改变(HE×100)

A-假手术组；B-CLP诱导后24h；C、D-溶媒对照组；E-SB203580预处理组；F-PTX预处理组

Fig 5 Lung injury and pulmonary protection of SB203580 and pentoxifyllin(HE×100)

A-sham operation group; B-24 hours after cecal ligation and puncture (CLP)

in animals; C-treatment with dissolvent 0.5% tragacanth(CLP+V); D-treatment with dissolvent 0.9% sodium chloride (CLP+N); E-pretreatment with SB203580 (CLP+SB); F-pretreatment with pentoxifylline(CLP+PTX)

3 讨论

PTX为甲基黄嘌呤衍生物、非选择性磷酸二酯酶抑制药，能增加细胞内cAMP，具有类似可可碱、咖啡因和茶碱的特性，并有改善血流动力学、抗炎、抗纤维化和免疫抑制的作用。近年研究发现，可用于防治ALI/ARDS^[7]。PTX可通过多种途径改善ALI，如抑制LPS引起的IL-6和TNF- α 的生成；减弱中性粒细胞与内皮细胞的黏附；促进IL-10的产生而反馈调节炎症网络^[8]，还可以抑制血管内皮细胞NOS基因的表达，使得iNOS产生减少，导致产生和释放NO减少^[9]、丙二醛(MDA)减少以及超氧化物歧化酶(SOD)的增多，还可以抑制金属蛋白酶以及ICAM-1的表达^[10]，有效阻断和干预肺损伤的形成和继续发展。目前，大多数关于PTX和ALI的研究工作主要集中在炎症介质和炎反应综合症方面。

p38MAPK信号通路信号转导通路存在于大多数细胞内，紫外线照射、促炎细胞因子(TNF- α 、IL-1)、应激刺激(过氧化氢、热休克、高渗环境、蛋白合成的抑制剂、缺血/再灌注)以及脂多糖(LPS)与G⁺细菌细胞壁成分均可激活，p38MAPK在介导炎症反应、应激等多种细胞反应中起着重要的作用：诸如单核/巨噬细胞表达TNF，IL-1，IL-6，IL-8，COX-2；中性粒细胞IL-8的合成、氧化爆发和弹性蛋白酶的释放；TNF和LPS介导的内皮细胞COX-2，PG合成、E-选择素的表达等均依赖p38MAPK的活化。脓毒症时，LPS使p38MAPK明显活化^[11]。脓毒症时涉及激酶，转录因子，免疫调节介质表达等的多条细胞内信号通路发生了变化，脓毒症肺损伤时中性粒细胞和其他细胞群的p38MAPK活性的提高，与临床严重的结果相关^[12]。MAPK磷酸脂酶-1基因敲除的脓毒症模型p38的失活时间明显延长，TNF- α 和IL-6表达显著增加^[13]。此次试验也证实了这一观点：CLP诱导了p38MAPK持续而时间依赖性的活化。特别是诱导后1h两者均明显的磷酸化，笔者推测这个时间点的活化最有可能是手术应激触发的^[14]。以后的各个时间点两者也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。

脓毒症是机体大量释放炎症介质引起过度炎

症反应或炎症失控的病理状态。可引起代偿性抗炎反应综合征 (compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS), 进展到 ALI/ARDS、MOF 阶段。尤其是促炎因子如 TNF- α 和 IL-6 的高表达在脓毒症 ALI 的病理过程中起这关键作用^[15-16]。本次试验所采用的 CLP 脓毒症 ALI 模型正是模拟其病理过程的早期高度炎症反应阶段: 过度分泌促炎因子即 SIRS 状态。p38MAPK 通过整合和传递细胞外应激信号以及协调细胞因子分泌、细胞迁移、凋亡在调节炎症反应的病理过程中起重要作用。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, 能清晰的评价和说明 p38MAPK 在 CLP 诱导的脓毒症肺损伤病理过程中的作用, 这与新近的研究使用另一种特异性抑制剂 SB239063 产生的结果一致^[17]。在此模型中使用 PTX 预处理是因为临床上广泛应用 PTX 治疗炎症反应为重要病理特征的疾病^[18]。实验表明, PTX 预处理能明显阻抑 p38MAPK 的活化, 降低促炎因子 TNF- α 和 IL-6 表达, 改善肺部的病理改变, 与特异抑制剂的作用相仿。就我们所知, 这是第一次清晰论证 PTX 肺保护作用与 p38MAPK 的关系: PTX 对 CLP 脓毒症诱导的肺组织 p38MAPK 活化的抑制效应。当然, PTX 压制 p38MAPK 活化, 进而抑制致炎细胞因子 TNF- α 和 IL-6 分泌的详尽分子机制尚需进一步阐明。

总之, PTX 阻抑 p38MAPK 的磷酸化可能是 PTX 抑制 CLP 诱导的大鼠脓毒症 ALI 促炎因子表达, 改善肺的病理改变, 最终发挥肺保护作用的分子机制。

致谢: 本试验从科研选题、实验设计到具体的实验操作、数据处理以及论文的撰写都是在导师刘功俭教授的亲自指导和关注下完成的。在科研思路及实验设计和完成上, 感谢徐州医学院麻醉学重点实验室段世明教授、沈幼珍教授、戴体俊教授、庞庆丰副教授、许鹏程副教授、苗蓓及其他诸位老师给予我的热心支持和帮助!

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(4): 443-448.

- [2] HARRISON D A, WELCH C A, EDDLESTON J M. The epidemiology of severe sepsis in England, Wales and Northern Ireland, 1996 to 2004: secondary analysis of a high quality clinical database, the ICNARC Case Mix Programme Database [J]. *Crit Care*, 2006, 10(2): R42.
- [3] FEIN A M, CALALANG-COLUCCI M G. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock [J]. *Crit Care Clin*, 2000, 16(2): 289-317.
- [4] XU J Y, MAO B L, QIAN G S. Effect of pentoxifylline on the expressions of several inflammatory cytokine genes in rats with sepsis-induced acute lung injury [J]. *Med J Chin PLA* (解放军医学杂志), 2003, 28(2): 102-104.
- [5] CHAUDRY I H, WICHTERMAN K A, BAUE A E. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels [J]. *Surgery*, 1979, 85(2): 205-211.
- [6] SINGLETON, KRISTEN D, PAUL E. Wischmeyer. Effects of HSP70.1/3 gene knockout on acute respiratory distress syndrome and the inflammatory response following sepsis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(5): L956-961.
- [7] WIEDEMANN H P, ARROLIGA A C, KOMARA J J. Emerging systemic pharmacologic approaches in acute respiratory distress syndrome [J]. *Respir Care Clin North Am*, 2003, 9(4): 419-435.
- [8] HADDAD J J, SAFIEH-GARABEDIAN B, SAADE N E, et al. The biphasic immunoregulation of pyrimidylpiperazine (Y-40138) is IL-10 sensitive and requires NF-kappa B targeting in the alveolar epithelium [J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 133(1): 49-60.
- [9] WU C C, LIAO M H, CHEN S J, et al. Pentoxifylline improves circulatory failure and survival in murine models of endotoxaemia [J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, 373(1): 41-49.
- [10] COIMBRA R, MELBOSTAD H, LOOMIS W, et al. LPS-induced acute lung injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition: effects on proinflammatory mediators, metalloproteinases, NF-kappaB, and ICAM-1 expression [J]. *J Traumatol*, 2006, 60(1): 115-125.
- [11] GUHA M, MACKMAN N. LPS induction of gene expression in human monocytes [J]. *Cell Signal*, 2001, 13(2): 85-94.
- [12] ABRAHAM E. Alterations in cell signaling in sepsis [J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 41(Suppl 7): S459-464.
- [13] ZHAO Q, WANG X, NELIN L D, et al. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(1): 131-140.
- [14] OBATA T, BROWN G E, YAFFE M B. MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway [J]. *Crit Care Med*, 2000, 28(4 Suppl): N67-77.
- [15] MARTINEZ M A, PENA J M, FERNANDEZ A, et al. Time course and prognostic significance of hemostatic changes in sepsis: Relation to tumor necrosis factor-alpha [J]. *Crit Care Med*, 1999, 27(7): 1303-1308.
- [16] TURNBULL I R, JAVADI P, BUCHMAN, T G, et al. Antibiotics improve survival in sepsis independent of injury severity but do not change mortality in mice with markedly elevated interleukin 6 levels [J]. *Shock*, 2004, 21(2): 121-125.
- [17] 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.
- [18] STAUBACH KH, SCHRODER J, STUBER F, et al. Effect of pentoxifylline in severe sepsis: results of a randomized, double-blind placebo controlled study [J]. *Arch Surg*, 1998, 133(1): 94-100.

收稿日期: 2010-01-19