

· 基础研究 ·

乌司他丁对脓毒症膈肌 p38 MAPK 信号通路的影响*

张红梅¹, 刘培^{2△}, 盛春风², 郑红梅³

(湖北医药学院附属太和医院: 1. 呼吸内科; 2. 重症医学科; 3. 普外科, 湖北十堰 442000)

摘要:目的 观察乌司他丁对脓毒症膈肌 p38 MAPK 信号通路的影响, 以探讨其对脓毒症膈肌损伤的保护作用。方法 SPF 级成年雄性 SD 大鼠 30 只, 随机分为 A 组(假手术组, $n=10$)、B 组(脓毒症组, $n=10$)及 C 组(乌司他丁治疗组, $n=10$)。其中, A 组在给予水合氯醛麻醉成功后, 从正中中线剪开大鼠腹部, 然后缝合伤口。B 组和 C 组在麻醉成功后, 使用盲肠结扎穿孔刺(CLP)模型将大鼠制成脓毒症动物模型, 并且 C 组在术后立即给予乌司他丁治疗。所有大鼠在术后 16 h 处死, 取左侧膈肌检测肌条收缩力, 右侧膈肌检测膈肌肌细胞凋亡率及 p38 MAPK 蛋白表达水平。结果 脓毒症组与假手术组比较, 膈肌肌细胞凋亡率及 p38 MAPK 蛋白表达明显上升, 肌条收缩力明显下降, 两组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。给予乌司他丁治疗后, 膈肌肌细胞凋亡率、p38 MAPK 蛋白表达及肌条收缩力较脓毒症组明显恢复, 两组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 乌司他丁能够有效抑制脓毒症时 p38 MAPK 蛋白的表达, 减少膈肌肌细胞凋亡率, 从而减轻脓毒症膈肌损伤。

关键词: 脓毒症; 细胞凋亡; 乌司他丁

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.18.021

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)18-2117-03

The effects of ulinastatin on p38 MAPK signal pathway in diaphragmatic damage caused by sepsis*

Zhang Hongmei¹, Liu Pei^{2△}, Sheng Chunfeng², Zheng Hongmei³

(1. Department of Respiratory; 2. Department of Critical Care Medicine; 3. Department of General Surgery, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective In order to explore the protective effects of ulinastatin against diaphragmatic damage caused by sepsis, we investigated the effects of ulinastatin on the p38 MAPK protein expression in the diaphragm. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into three groups: Group A (Sham-operated group, $n=10$), Group B (Sepsis group, $n=10$) and Group C (ulinastatin-treated group, $n=10$). The rats of Group A were only cut from the abdomen, and then sutured the wound after the anesthetic. The rats of Group B and C were made into Cecal ligation and puncture model (CLP), and then the rats of Group C were treated with ulinastatin. All rats were killed at 16 hours after operations, taken the left side of diaphragm muscle to detect the contractile force and taken the right side of diaphragm muscle to detect the diaphragmatic muscle cell apoptosis rate and the p38 MAPK protein expression. **Results** Group B compared with Group A, diaphragm contractility significant drop, the rate of diaphragm muscle cell apoptosis, the number of p38 MAPK protein expression was significantly increased, the two groups was significant difference ($P<0.01$). After the ulinastatin therapy, the diaphragmatic muscle cell apoptosis rate, the number of p38 MAPK protein expression and the contractile force were resumed obviously. **Conclusion** Ulinastatin can effectively inhibit sepsis p38 MAPK protein expression, reduce the rate of diaphragm muscle cell apoptosis, thereby reducing sepsis diaphragmatic injury.

Key words: sepsis; apoptosis; ulinastatin

脓毒症(sepsis)是重症感染引起的全身炎症反应综合征(SIRS), 进一步可发展成为多器官功能衰竭(MODS)^[1]。在早期的研究中作者已经发现 p38 MAPK 信号通路可能是通过促进膈肌肌细胞凋亡机制来参与脓毒症膈肌损伤, 并且给予乌司他丁治疗后膈肌损伤减轻, 膈肌肌细胞凋亡率减少。为了进一步探讨乌司他丁对脓毒症膈肌 p38 MAPK 信号通路的影响, 本研究选用成年雄性 SD 大鼠制作盲肠结扎穿孔刺(CLP)模型, 观察 p38 MAPK 蛋白表达、肌细胞凋亡率及肌肉收缩力。

1 材料与与方法

1.1 动物与分组 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 250~300 g, 由郧阳医学院实验动物中心提供。采用随机化数字法, 将大鼠随机分为 3 组, A 组(假手术组, $n=10$)、B 组(脓毒症组, $n=$

10)及 C 组(乌司他丁治疗组, $n=10$)。

1.2 CLP 模型的建立^[2] 将购来的 SD 大鼠在实验室饲养 1 周以上, 实验前禁食 24 h, 自由饮水。以 10% 水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔麻醉后固定。假手术组大鼠沿下腹部中线位置纵行切开长约 2 cm 切口, 寻找到盲肠后轻提起盲肠并将之回纳入腹腔, 不作任何处理, 缝合伤口。B 组大鼠在麻醉后切开左颈外动脉, 留置导管, 监测平均动脉压(mean arterial pressure, MAP), 记录血压基础值。手术分层打开腹腔, 寻找到盲肠后提起其末端, 暴露回盲部以 1.0 丝线结扎盲肠远端 2/3 部分, 并用 18 号针穿刺盲肠 2 次, 1 孔在盲肠末端, 1 孔在盲肠近端, 轻压盲肠让少量肠内容物排至腹腔内。然后将盲肠还纳腹腔, 逐层缝合腹壁切口。术后立即给动物皮下注射林格液 50

* 基金项目: 十堰市科技公关基金资助项目(2009045D)。 作者简介: 张红梅(1980~), 主治医师, 主要从事临床呼吸疾病的研究。

△ 通讯作者, Tel: 18772817340; E-mail: lpwelcom0545@sina.com。

mL/kg 体质量抗休克。手术完成后,观察血压值变化,当所监测血压值下降幅度超过基础值的 20% 且持续 20 min 以上时,即可认为达到早期脓毒性休克标准,实验模型建立^[3]。术后观察大鼠的健康情况。

1.3 乌司他丁治疗方法 C 组大鼠在制作 CLP 模型后立即给予乌司他丁 20 000 U 腹腔注射,并且于 8 h 后再次给予乌司他丁 20 000 U 腹腔注射。而 A 组不作任何处理,B 组大鼠则在制作模型后立即及 8 h 后给予生理盐水 2 mL 腹腔注射作为对照。

1.4 膈肌细胞凋亡率检查 新鲜膈肌组织用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,连续切片。用武汉博士德公司提供的原位细胞凋亡检测试剂盒 TUNEL 法检测膈肌细胞凋亡程度。

1.5 膈肌肌条收缩力检测 处死动物后,剖腹速取左侧肋膈肌,包括中心腱及肋骨,置于 37.8 °C,通有 95% O₂ 与 5% CO₂ 混合气体的林格氏液浴槽中(pH 7.4)。将膈肌剪成 5 mm × 15 mm 的肌条。肌条肋骨端固定在浴槽底部,中心腱端连接于经过标化校准的张力换能器上,张力换能器连接于多道生理记录仪。将肌条置于两片铂金电极间,采用刺激仪予以 0.5 ms 单脉冲方波刺激(刺激参数前负荷:2 g,时间常数:DC,高频滤波:30 Hz,增益:10 g),每个刺激间隔 2 h。初始刺激强度为 0.1 mA,逐渐增大刺激强度,每次增加 0.05 mA,当得到的肌肉收缩力不再增大时获得的收缩力为最大收缩力。肌条收缩力 = 最大收缩力/肌条横截面积,横截面积 = 肌条重量(g)/[肌条长度 × 肌肉密度(1.056 g/cm³)]。

1.6 统计学处理 实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 软件对数据进行处理。免疫组化灰度分析应用 Image-Pro 6.0 分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 假实验组大鼠术后一般状况良好,行动自如,

呼吸平稳,饮食正常。B 组大鼠术后精神萎靡、行动迟缓、轻度竖毛、移动减少、喜静卧、群聚减少。A 组大鼠腹腔内肠管正常或有少量粘连,肠黏膜正常或轻度水肿、充血。B 组大鼠腹腔内有血性或脓性渗出液,带恶臭,肠管胀气,内脏充血水肿失去原有光泽,肠黏膜充血水肿明显。B 组血压值术后下降幅度超过基础血压值的 20% 且持续 20 min 以上。而 A 组其血压值术后没有明显下降。

2.2 p38 MAPK 蛋白表达、膈肌肌细胞凋亡率及膈肌收缩力检测 制作脓毒症模型后,B 组膈肌肌条收缩力较 A 组明显下降,肌细胞凋亡率及 p38 MAPK 蛋白表达明显上升。但给予乌司他丁治疗后,虽然 C 组膈肌肌条收缩力仍较 A 组下降,肌细胞凋亡率及 p38 MAPK 蛋白表达上升。C 组膈肌肌条收缩力、p38 MAPK 蛋白表达及肌细胞凋亡率均较 B 组有改善,3 个方面比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 3 组大鼠 p38 MAPK 蛋白表达、膈肌肌细胞凋亡率及膈肌收缩力比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 膈肌肌细胞 凋亡率(%) | p38 MAPK 蛋白 平均灰密度($\times 10^{-3}$) | 肌条收缩力 (N/cm ²) $\times 10^{-3}$ |
|-----|-----------------|--|--|
| A 组 | 1.71 ± 1.38 | 10.22 ± 3.94 | 1 035.46 ± 34.32 |
| B 组 | 25.16 ± 2.71* | 157.24 ± 19.16* | 174.87 ± 28.83* |
| C 组 | 14.42 ± 1.03*# | 93.27 ± 12.20*# | 300.59 ± 19.94*# |

*: $P < 0.01$,与 A 组比较; #: $P < 0.01$,与 B 组比较。

2.3 膈肌病理切片 图 1 所示 A 组膈肌结构基本正常;图 2 为制作脓毒症模型 16 h 后膈肌组织,组织水肿明显,并有较多炎性细胞浸润;图 3 为乌司他丁治疗后膈肌组织,组织水肿减轻,炎性细胞较前减少。

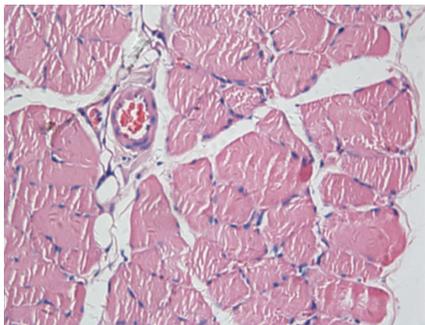


图 1 A 组膈肌病理切片
(HE, ×400)

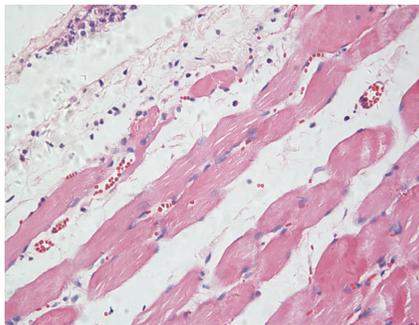


图 2 B 组膈肌病理切片
(HE, ×400)

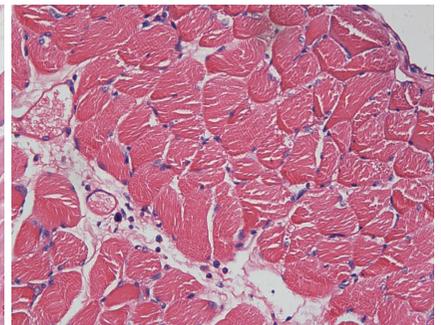


图 3 C 组膈肌病理切片
(HE, ×400)

3 讨论

研究发现,脓毒症时膈肌的收缩力明显下降^[4]。在本实验中同样也观察到,制作 CLP 模型后膈肌收缩力明显下降,只有 A 组的 20% 左右。而膈肌作为主要的呼吸肌,其收缩力下降又是脓症患者长时间不能撤离呼吸机的主要原因之一^[5]。因此,对脓毒症膈肌损伤机制的研究对制定有效的防治措施、降低术后并发症、死亡率、改善患者生存质量及降低医疗成本,具有重要的意义。

MAPK 信号通路存在于大多数细胞内,是介导细胞反应的重要信号系统,参与了细胞生长、发育、分化及凋亡等^[6]。

p38 信号通路是 MAPK 家族的重要组成成员,被认为属于“应激诱导”的 MAPK。而 p38 MAPK 促进凋亡的机制可能为:内毒素激活 p38 MAPK 信号通路后,p38 可进一步促使凋亡激活转录因子-2 磷酸化,核因子- κ B 从胞液易位至细胞核,促使 DNA 断裂,最终发生细胞的肥大和凋亡^[7]。本研究观察到随着 p38 MAPK 蛋白表达增加,膈肌肌细胞凋亡率也明显增加。而膈肌中凋亡细胞数目的增加,有收缩功能的细胞百分比势必下降,那么也必然会对收缩力产生影响。抑制 p38 MAPK 信号通路对于改善脓毒症膈肌损伤具有重要意义^[8]。

乌司他丁是在人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、脂水解酶、糖水解酶和不良刺激引起的炎性因子的释放^[9],已广泛应用于急性胰腺炎、急性循环衰竭、改善器官缺血再灌注^[10]。本研究发现,制作脓毒症模型后给予乌司他丁治疗能够明显减少 p38 MAPK 蛋白表达。并且在前期研究中作者发现乌司他丁能够明显减少脓毒症时膈肌内氧自由基释放,降低 SOD 消耗。而氧自由基能够作为第二信号增加 p38 MAPK 蛋白表达,促进 p38 MAPK 磷酸化^[11]。因此,乌司他丁可能是通过减少氧自由基释放、减轻氧化应激反应来抑制 p38 MAPK 信号通路。

综上所述,乌司他丁能够有效抑制 p38 MAPK 信号通路,减少膈肌细胞凋亡率,减轻脓毒症膈肌损伤程度。因此,乌司他丁对于防治脓毒症并发症,降低死亡率,改善患者生活质量有重要意义。

参考文献:

- [1] Bhatia M, He M, Zhang H, et al. Sepsis as a model of SIRS[J]. *Front Biosci*, 2009, 14: 4703-4711.
- [2] Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, et al. Cecal ligation and puncture[J]. *Shock*, 2005, 23(1): 52-57.
- [3] 齐宇洁,樊寻梅,周涛,等.不同剂量氢化可的松对早期脓毒性休克大鼠炎症介质分泌的影响[J]. *中国小儿急救医学*, 2007, 14(3): 235-238.
- [4] Powers SK. Calpain and caspase-3 are required for sepsis-induced diaphragmatic weakness [J]. *J Appl Physiol*, 2009, 107(5): 1369-1371.
- [5] Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, et al. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress

- syndrome[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1985, 132(2): 485-489.
- [6] Sasaki K, Chiba K. Induction of apoptosis in starfish eggs requires spontaneous inactivation of MAPK (extracellular signal-regulated kinase) followed by activation of p38 MAPK [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(3): 1387-1396.
- [7] Sharma, Avadhesh C. Spesis- induced myocardial dysfunction[J]. *Shock*, 2007, 28(3): 265-269.
- [8] Guo W, Liu W, Chen G, et al. Water-soluble andrographolide sulfonate exerts anti-sepsis action in mice through down-regulating p38 MAPK, STAT3 and NF-kappaB pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(4): 613-619.
- [9] Kim MS, Park JW, Lim YH, et al. Effect of ulinastatin on the rocuronium-induced neuromuscular blockade[J]. *Korean J Anesthesiol*, 2012, 62(3): 240-244.
- [10] Shin IW, Jang IS, Lee SM, et al. Myocardial protective effect by ulinastatin via an anti-inflammatory response after regional ischemia/reperfusion injury in an in vivo rat heart model[J]. *Korean J Anesthesiol*, 2011, 61(6): 499-505.
- [11] Hsieh CC, Papaconstantinou J. Thioredoxin-ASK1 complex levels regulate ROS-mediated p38 MAPK pathway activity in livers of aged and long-lived snell dwarf mice [J]. *FASEB J*, 2006, 20(2): 259-268.

(收稿日期:2012-11-08 修回日期:2013-02-22)

(上接第 2116 页)

- 吟对吸烟者大隐静脉桥内皮功能的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(5): 520-522.
- [7] 李世康,栗振坤,龙村,等.四氢生物蝶呤保存液对 2 型糖尿病患者大隐静脉氧化应激的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(11): 1289-1291.
- [8] 李世康,栗振坤,龙村. 2 型糖尿病对冠心病患者大隐静脉桥内皮细胞的影响[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2011, 27(8): 480-482.
- [9] Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors[J]. *FASEBJ*, 1989, 30(16): 2007-2015.
- [10] Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives[J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(3): 327-387.
- [11] Jin X, Satoh-Otonashi Y, Zamami Y, et al. New molecular mechanisms for cardiovascular disease: contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of vasoconstriction in peripheral resistance arteries[J]. *J*

Pharmacol Sci, 2011, 116(4): 332-336.

- [12] Garland CJ, Hiley CR, Dora KA. EDHF: spreading the influence of the endothelium[J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 164(3): 839-852.
- [13] Ren Z, Yang Q, Floten HS, et al. ATP-sensitive potassium channel openers may mimic the effects of hypoxic preconditioning on the coronary artery [J]. *Ann Thorac Surg*, 2001, 71(6): 642-647.
- [14] Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(6): 733-741.
- [15] Andersen A, Povlsen JA, Bötter HE, et al. Ischemic preconditioning reduces right ventricular infarct size through opening of mitochondrial potassium channels[J]. *Cardiology*, 2012, 123(3): 177-180.

(收稿日期:2012-10-28 修回日期:2013-03-10)