

# p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂 对脓毒症大鼠多器官损伤的保护作用研究

马中富 乐胜 梁艳冰 詹红 唐皓 荆小莉

**【摘要】目的** 探讨脓毒症致多器官损伤的原因,以及 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)抑制剂的保护作用 and 机制。**方法** 采用盲肠结扎穿刺术(CLP)制备脓毒症大鼠模型,治疗组采用术前给予 p38MAPK 抑制剂 SB203580 灌胃。在不同时间点观察大鼠血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )以及生化指标如丙氨酸转氨酶(ALT)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、肌酸磷酸激酶-同工酶(CPK-MB)浓度的变化。**结果** CLP术后大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  显著升高,ALT、BUN、Cr、CPK-MB 也进行性升高;血清 ALT、BUN、Cr、CPK-MB 变化与 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  呈显著正相关。应用 SB203580 后,血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 浓度显著降低,同时 ALT、BUN、Cr、CPK-MB 也降低。**结论** TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的大量释放是脓毒症致多器官损伤的原因之一,通过调控 p38MAPK 信号转导通路可对脓毒症所致多器官损伤起保护作用。

**【关键词】** 脓毒症; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 白细胞介素-1 $\beta$

**Protective effect of p38 mitogen activated protein kinase inhibitor on organs in sepsis in rats** MA Zhong-fu, LE Sheng, LIANG Yan-bing, ZHAN Hong, TANG Hao, JING Xiao-li. Emergency Department, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

**【Abstract】Objective** To investigate the pathogenesis of multiorgan injury and the protective of p38 mitogen activated protein kinase (p38MAPK) inhibitor on organs in sepsis. **Methods** Cecal ligation and puncture was adopted to reproduce sepsis model. The levels of serum biochemical parameters (including alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), MB isoenzyme of creatine phosphokinase (CPK-MB), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) were determined at different time points. **Results** The levels of ALT, BUN, Cr, CPK-MB, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  rose progressively after the cecal ligation operation. The levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  showed a significant correlation with levels of ALT, BUN, Cr, CPK-MB. After the administration of p38MAPK inhibitor, SB203580, the level of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were found to decrease evidently, and the injury to multiple organs was alleviated. **Conclusion** Excessive secretion of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  may be the main cause of multiorgan injury in sepsis. Modulation of the p38MAPK pathway may protect multiorgan injury in sepsis.

**【Key words】** sepsis; p38mitogen activated protein kinase; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; interleukin-1 $\beta$

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)为细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是介导细胞反应的重要信号系统。p38 信号转导通路是 MAPK 家族重要成员,在炎症反应及细胞应激、迁移、凋亡等方面起重要作用<sup>[1,2]</sup>。本研究拟通过抑制 p38MAPK 信号通路,探讨对脓毒症时多器官损伤的保护作用及其可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物和主要试剂:**健康雄性 SD 大鼠,体重 190~220 g,由中山大学北校区实验动物中心提

供。p38MAPK 抑制剂 SB203580 为 Alexis 公司产品;肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )酶联免疫吸附法(ELISA)测定试剂盒为深圳晶美公司产品。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 脓毒症动物模型制备:**66 只健康雄性 SD 大鼠,体重 190~220 g,随机分为正常对照组(6 只),盲肠结扎穿刺术(CLP)组(30 只)和 CLP 后治疗组(30 只)。动物模型制备按 CLP 方法。治疗组术前灌胃给予 SB203580(用 0.03 mol/L HCl 和质量分数为 0.5%的 Canth 溶解),10 mg/kg,每 12 h 1 次。动物术前禁食 12 h,实验过程中自由饮水。采用体积分数为 10%的水合氯醛(3 mg/kg)腹腔注射麻醉,麻醉后固定动物,消毒后开腹,分离出盲肠,在盲肠与小肠及大肠交界处环行结扎盲肠,在盲肠末端用 9 号针头贯穿穿刺两次,关闭腹腔,术后皮下注射生

基金项目:广东省广州市科委重点攻关课题(2001-Z-130-02);广东省医学科研基金资助项目(A2003176)

作者单位:510080 广东广州,中山大学附属第一医院急诊科

作者简介:马中富(1963-),男(汉族),湖南省永州市人,医学博士,副主任医师,硕士研究生导师,主要从事脓毒症、多器官功能障碍综合征临床与基础研究,发表论文 40 余篇(E-mail:ma\_zf@163.net)。

理盐水 5 ml/100 g 以补充手术过程中体液的丢失。术后 1、3、6、12 和 24 h 各取 6 只大鼠,抽取 2 管股静脉血各 1 ml,分离出血清,用于测定生化指标。

**1.2.2 血清生化指标检查:**采用 7170 型全自动生化分析仪(日本 Hitachi 公司生产)测定丙氨酸转氨酶(ALT)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)和肌酸磷酸激酶-同工酶(CPK-MB)。

**1.2.3 血清 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  浓度检测:**应用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测。抗大鼠 TNF- $\alpha$  或 IL-1 $\beta$  单克隆抗体包被于酶标板上,将标本和稀释后的标准品依次加入酶标板孔中与之结合,孵育后洗去未结合物,加入生物素化的抗体,再经过温育、洗涤、显色等过程,最后在酶标仪 450 nm 处测吸光度(A 值),通过绘制标准曲线求出标本的 TNF- $\alpha$  或 IL-1 $\beta$  浓度。

**1.3 统计学方法:**所有数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本的 *t* 检验;多组间比较根据方差齐性检验结果,方差齐时采用 LSD 单因素方差分析,方差不齐时采用 Tamhane 方差分析;相关分析采用 Spearman 直线相关分析。所有数据均用 SPSS 11.0 统计软件处理, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  浓度与各脏器损害的相关性分析(表 1):**IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  浓度与 ALT、BUN、Cr、CPK-MB 均呈显著正相关( $P$  均 $<0.01$ )。

表 1 脓毒症大鼠炎症介质与生化指标的相关分析( $r$  值)

Table 1 Correlation analysis between the inflammatory factors and the biological chemistry parameters( $r$ )

指标	ALT	BUN	Cr	CPK-MB
IL-1 $\beta$	0.891*	0.804*	0.834*	0.918*
TNF- $\alpha$	0.941*	0.885*	0.902*	0.905*

注: \* $P<0.01$

**2.2 p38MAPK 抑制剂 SB203580 对血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  浓度的影响(表 2):**正常大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  浓度较低。CLP 后血清 IL-1 $\beta$  浓度迅速升高,于 12 h 到达高峰,是基础值的 12 倍,而后仍维持在较高水平;TNF- $\alpha$  也急剧升高,并进行性增加,持续升高到 24 h,为基础值的 8.6 倍。与正常组比较差异均有显著性( $P<0.05$ )。

治疗组 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  浓度也进行性增加,与正常组比较差异有显著性( $P<0.05$ ),但其升高幅度较 CLP 组明显减小,各相应时间点与 CLP 组比较差异有显著性( $P<0.05$ ),其中 IL-1 $\beta$  最高抑制达 39.0%,TNF- $\alpha$  为 52.5%。

表 2 各组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  浓度变化( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Levels of serum IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in different groups( $\bar{x}\pm s$ )

组别	时间(h)	动物数(只)	IL-1 $\beta$ (ng/L)	TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/L)
正常对照组		6	85.7 $\pm$ 16.9	0.64 $\pm$ 0.10
CLP 模型组	1	6	289.7 $\pm$ 54.9*	1.18 $\pm$ 0.12*
	3	6	421.3 $\pm$ 33.7*	1.96 $\pm$ 0.10*
	6	6	763.3 $\pm$ 56.0*	3.07 $\pm$ 0.16*
	12	6	1033.7 $\pm$ 105.0*	4.87 $\pm$ 0.65*
	24	6	962.8 $\pm$ 92.9*	5.48 $\pm$ 0.72*
SB203580	1	6	234.0 $\pm$ 46.5*#	0.82 $\pm$ 0.08*#
治疗组	3	6	316.8 $\pm$ 40.8*#	1.30 $\pm$ 0.12*#
	6	6	423.5 $\pm$ 46.0*#	1.70 $\pm$ 0.21*#
	12	6	628.3 $\pm$ 72.7*#	2.68 $\pm$ 0.37*#
	24	6	633.3 $\pm$ 79.6*#	2.60 $\pm$ 0.54*#

注:与正常对照组比较: \* $P<0.05$ ;与 CLP 模型组相应时间点比较: # $P<0.05$

**2.3 p38MAPK 抑制剂 SB203580 对血清生化指标的影响(表 3):**CLP 大鼠血清 ALT、CPK-MB、BUN、Cr 水平均显著升高,各时间点与正常对照组比较差异均显著( $P$  均 $<0.05$ ),且呈进行性升高。在应用 p38MAPK 抑制剂 SB203580 后,治疗组血清 4 种指标水平的升高均明显受抑( $P$  均 $<0.05$ )。

表 3 各组大鼠血清生化指标的变化( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Changes of the level of serum biological chemistry parameters in different groups( $\bar{x}\pm s$ )

组别	时间(h)	动物数(只)	ALT(U/L)	BUN(mmol/L)	Cr( $\mu$ mol/L)	CPK-MB(U/L)
正常对照组		6	31.5 $\pm$ 5.1	6.9 $\pm$ 0.9	51.8 $\pm$ 6.3	268.0 $\pm$ 86.3
CLP 模型组	1	6	51.7 $\pm$ 5.7*	7.2 $\pm$ 0.6	50.8 $\pm$ 7.1	369.0 $\pm$ 46.7*
	3	6	90.7 $\pm$ 6.9*	9.3 $\pm$ 0.5*	55.3 $\pm$ 6.8	480.3 $\pm$ 40.2*
	6	6	163.7 $\pm$ 9.3*	13.5 $\pm$ 1.3*	81.7 $\pm$ 6.9*	1085.5 $\pm$ 138.4*
	12	6	212.2 $\pm$ 18.1*	18.0 $\pm$ 0.8*	147.0 $\pm$ 16.0*	1250.5 $\pm$ 112.9*
	24	6	273.2 $\pm$ 13.2*	25.7 $\pm$ 4.0*	157.7 $\pm$ 12.4*	1176.7 $\pm$ 97.7*
SB203580 治疗组	1	6	49.0 $\pm$ 5.4*	7.0 $\pm$ 0.6	55.0 $\pm$ 4.6	274.3 $\pm$ 15.6#
	3	6	70.3 $\pm$ 7.0*#	9.1 $\pm$ 0.7*	54.8 $\pm$ 5.8	312.0 $\pm$ 17.3#
	6	6	82.8 $\pm$ 10.7*#	10.4 $\pm$ 1.1*#	50.5 $\pm$ 6.3#	690.2 $\pm$ 99.2*#
	12	6	109.3 $\pm$ 9.9*#	12.1 $\pm$ 1.0*#	61.3 $\pm$ 5.5#	725.3 $\pm$ 78.7*#
	24	6	81.8 $\pm$ 11.4*#	9.4 $\pm$ 1.2#	67.0 $\pm$ 8.6*#	639.7 $\pm$ 72.2*#

注:与正常对照组比较: \* $P<0.05$ ;与 CLP 模型组相应时间点比较: # $P<0.05$

### 3 讨论

脓毒症和多器官功能障碍综合征(MODS)是严重感染、休克、烧伤患者常见的并发症,其发病迅速,临床救治难度大,病死率高。因此,如何降低脓毒症、MODS 的发病率及病死率是目前急危重病医学面临难题之一。近 20 多年来,随着对脓毒症、MODS 研究的不断进展,对其发病机制逐渐有了一致的看法,即全身炎症反应综合征(SIRS)是 MODS 重要的病理学基础和形成的根本原因<sup>[3]</sup>。在 SIRS 中产生的炎症因子众多,其中 TNF 及 IL-1 是主要和关键的炎症介质,能直接导致多器官的损伤。本研究发现,CLP 致大鼠脓毒症时,血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  浓度明显升高,同时血清 ALT、BUN、Cr、CPK-MB 也明显升高,说明肝、肾、心等脏器功能明显受损。相关分析发现,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  浓度与血清 ALT、BUN、Cr、CPK-MB 呈显著正相关,说明脓毒症时大量释放的炎症因子确实是导致多器官损害的主要原因之一。

鉴于 SIRS 是脓毒症、MODS 形成的根本原因,除了治疗原发病外,抗炎治疗已成为处理脓毒症的基本策略之一。近 10 多年来国内外学者在应用拮抗炎症介质,如抗 TNF、抗 IL-1、抗血小板激活因子(PAF)等治疗脓毒症、MODS 方面进行了大量临床研究,发现这些措施未能降低脓毒症和 MODS 的发生率及病死率<sup>[4,5]</sup>。如 Symons 等<sup>[6]</sup>在用 IL-1 受体拮抗剂治疗 893 例脓毒症患者的 III 期临床试验中发现,患者 28 d 病死率并未减少。Reinhart 等<sup>[7]</sup>在采用 TNF- $\alpha$  抗体片段(MAK195F)治疗 122 例严重脓毒症或脓毒症休克患者的 II 期临床试验中发现,各组病死率差异也无显著性。究其原因可能是 SIRS 时产生的炎症介质众多,单纯用一种或几种炎症介质拮抗剂或抗体来治疗 MODS 很难取得满意效果。因此,如能从调控炎症反应的“瓶颈”——即关键环节进行干预,如核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、MAPK 信号通路等,才有可能从根本上解决这一难题<sup>[2,8]</sup>。

MAPK 信号转导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。p38 信号转导通路是 MAPK 家族的重要组成成员,在炎症反应方面起着重要作用。Obata 等<sup>[9]</sup>研究证实,LPS 刺激中性粒细胞能引起 p38MAPK 磷酸化,从而增强 TNF- $\alpha$  mRNA 及蛋白质表达。p38MAPK 在被磷酸化激活后细胞产生的一种反应就是释放大量致炎因子,如 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 和 IL-8<sup>[10,11]</sup>。有证据显示,人类中性

粒细胞合成 TNF- $\alpha$  时在转录水平甚至在翻译水平都要受 p38MAPK 的调节<sup>[12]</sup>。本研究中使用的是 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580,发现其能显著降低脓毒症大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  浓度,其中 IL-1 $\beta$  最高抑制达 39.0%,TNF- $\alpha$  为 52.5%,同时血清 ALT、BUN、Cr、CPK-MB 较对照组显著减少,说明通过抑制 p38MAPK 信号通路,能显著改善脓毒症时多器官的损伤。

综上所述,p38MAPK 信号转导通路参与了脓毒症的发病过程,通过调控 p38MAPK 信号转导通路,能降低炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的产生,从而保护脓毒症时多器官的功能,这也为以后脓毒症、MODS 的治疗提供了新的途径。

### 参考文献:

- Hale K K, Trollinger D, Rihaneck M, et al. Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages [J]. J Immunol 1999, 162: 4246-4252.
- 姚咏明, 盛志勇. 脓毒症信号转导机制的现代认识 [J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 3-6.
- 梁华平, 王正国, 朱佩芳. 针对 SIRS 的新型抗炎靶点及抗炎策略研究进展——从炎症介质到核因子- $\kappa$ B [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13: 649-652.
- 姚咏明, 盛志勇. MODS 抗炎治疗研究的反思 [J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11: 456-458.
- 林洪远. 脓毒症——挑战与对策 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 325-327.
- Symons J A, Young P R, Duff G W. Soluble type I interleukin-1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 1714-1718.
- Reinhart K, Wiegand Lohnert C, Grimminger F, et al. Assessment of the safety and efficacy of the monoclonal anti tumor necrosis factor antibody fragment, MAK195F, in patients with sepsis and septic shock: a multicenter, randomized, placebo controlled, dose ranging study [J]. Crit Care Med, 1996, 24: 742-773.
- Lee J C, Kassiss S, Kumar S, et al. p38 mitogen activated protein kinase inhibitor - mechanisms and therapeutic potentials [J]. Pharmacol Ther, 1999, 82: 389-397.
- Obata T, Brown G E, Yaffe M B. MAP kinase pathways activation by stress: the p38 MAPK pathway [J]. Crit Care Med, 2000, 28: N67-N77.
- Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function [J]. Cell Signal, 2000, 12: 1.
- Branger J, van den Blink B, Weijer S, et al. Anti-inflammatory effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia [J]. J Immunol, 2002, 168: 4070-4077.
- Nick J A, Avdi N J, Young S K, et al. An intracellular signaling pathway linking lipopolysaccharide stimulation to cellular responses of the human neutrophil: the p38 MAP kinase cascade and its functional significance [J]. Chest, 1999, 116 (1 Suppl): 54S-55S.

(收稿日期: 2004-12-08 修回日期: 2005-03-19)

(本文编辑: 李银平)