

多器官功能障碍综合征患者外周血白三烯 B4 与 p38 丝裂原活化蛋白激酶的变化

唐皓 马中富 梁艳冰 翟诚顺 熊仕秋 熊艳

【摘要】目的 探讨多器官功能障碍综合征(MODS)患者外周血白三烯 B4 (LTB4)与 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)含量的变化及与 MODS 病情的关系。**方法** 对 26 例 MODS 患者进行病情评分,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血中 LTB4 与 p38 MAPK 含量,并与 12 例健康体检者进行对照。比较 MODS 患者 MODS 评分与外周血 LTB4 和 p38 MAPK 的相互关系,及 MODS 组死亡与存活患者的 MODS 评分、外周血 LTB4 与 p38 MAPK 含量。**结果** MODS 患者血清 LTB4 含量为(923.96±308.65)ng/L,明显低于健康对照组(2453.31±400.93)ng/L($P<0.05$);MODS 患者血清中 p38 MAPK 含量为(193.83±106.32)ng/L,与健康对照组(124.36±84.50)ng/L 比较差异无显著性($P>0.05$)。MODS 组中死亡患者的血清 LTB4 含量为(444.98±206.30)ng/L,明显低于存活患者的(1334.51±530.35)ng/L($P<0.05$);p38 MAPK 含量为(272.08±207.37)ng/L,明显高于存活患者(115.59±57.99)ng/L($P<0.05$)。**结论** MODS 晚期病理生理变化与一般炎症反应有所不同。外周血 LTB4 与 p38 MAPK 可作为 MODS 病情严重程度及预后判断指标。

【关键词】 多器官功能障碍综合征; 白三烯 B4; p38 丝裂原活化蛋白激酶

Study on the changes in serum leukotrienes B4 and p38 mitogen activated protein kinase in multiple organ dysfunction syndrome TANG Hao*, MA Zhong-fu, LIANG Yan-bing, ZHAI Cheng-shun, XIONG Shi-qiu, XIONG Yan. * Emergency Department, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong China

Corresponding author: MA Zhong-fu (Email: ma_zf@163.net)

【Abstract】Objective To investigate the changes in serum leukotrienes B4(LTB4) and p38 mitogen activated protein kinase(p38 MAPK) in multiple organ dysfunction syndrome (MODS) and to evaluate the relationship between LTB4 and p38 MAPK and clinical condition of patients with MODS. **Methods** The clinical condition of 26 patients with MODS was evaluated with scoring system. The serum LTB4 and p38 MAPK of the said patients and that of 12 healthy individuals were determined with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The correlation of the scores of MODS and levels of serum LTB4 and p38 MAPK was analyzed. The correlation of the scores of MODS and levels of serum LTB4 and p38 MAPK was analyzed in non-survivors and survivors. **Results** The serum level of LTB4 [(923.96±308.65)ng/L] was significantly lower in MODS patients compared with control group [(2453.31±400.93)ng/L, $P<0.05$]. There was no significant difference in serum level of p38 MAPK between the patients with MODS [(193.83±106.32)ng/L] and control group [(124.36±84.50)ng/L, $P>0.05$]. There was significant difference in the serum level of LTB4 between the survivors [(1334.51±530.35)ng/L] and non-survivors [(444.98±206.30)ng/L, $P<0.05$]. There were significant negative correlations between serum LTB4 and MODS scores ($P<0.001$). **Conclusion** The pathophysiological changes in later period of MODS are different from those of other common inflammatory responses. Serum LTB4 and p38 MAPK could be one of the indexes of the seriousness and prognosis on MODS.

【Key words】 multiple organ dysfunction syndrome; leukotriene B4; p38 mitogen activated protein kinase

近些年来,医学界对多器官功能障碍综合征(MODS)的认识越来越深入,“瀑布效应”学说提出

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 广州,中山大学附属第一医院急诊科(唐皓,马中富,梁艳冰,翟诚顺,熊艳);中山大学免疫教研室(熊仕秋)

通讯作者:马中富(Email:ma_zf@163.net)

作者简介:唐皓(1973-),女(汉族),四川省荣县人,医学硕士,主治医师,主要从事危重病和 MODS 的基础和临床研究,发表论文 10 余篇。

的全身多种细胞因子及炎症介质失控性释放与 20 世纪 90 年代 Bone^[1]提出的免疫/炎症失调理论,均指出了炎症因子在 MODS 发病过程中的重要作用。目前尽管采取各种措施对危重患者积极进行器官功能支持,其病死率仍高达 70%左右^[2]。本研究通过测定 MODS 患者血清中白三烯 B4(LTB4)及 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)含量,探讨它们在 MODS 疾病过程中的作用,为 MODS 的辅助诊断、预后分析及新的治疗措施研究提供依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象:2003 年 10 月—2004 年 4 月入住中山大学附属第一医院急诊科重症监护治疗病房(EICU)与外科重症监护治疗病房(SICU)的危重患者 26 例,均符合 1991 年美国胸科医师学会和危重病医学会(ACCP/SCCM)联席会议联合倡议提出的 MODS 诊断标准。其中男 15 例,女 11 例;年龄 18~81 岁,平均(48.38±21.25)岁;原发病:心肺复苏后 5 例,手术创伤 9 例,严重脓毒症 10 例,失血性休克 2 例;MODS 评分 7~20 分,平均(14.65±4.28)分。对照组为与 MODS 组年龄、性别相匹配的健康体检者 12 人,其中男 7 例,女 5 例;年龄 20~70 岁,平均(43.75±15.27)岁。MODS 患者均未接受抗肿瘤药物、放射治疗和免疫抑制剂治疗。

1.2 检测方法:采集 MODS 患者确诊 48 h 内静脉血 5 ml,立即注入无菌干燥管,离心(3 600 r/min, 4 ℃)15~30 min,取血清于-20 ℃下冻存待测。健康体检者采集晨起空腹静脉血,方法同 MODS 患者。LTB₄ 和 p38MAPK 检测试剂盒均为美国 Assay Designs, Inc. 公司产品;去离子水,苯甲磺酰氟(PMSF),混合蛋白酶抑制剂(PIC),100~1 000 μl 精确吸管,烧杯,量筒,摇板机,吸水纸,450 nm 微板光度计,绘图纸,37 ℃恒温水浴箱。

1.3 LTB₄ 检测:所有试剂打开前至少在室温下平衡 30 min,所有标准品、质控和样本都做双份检测,按试剂盒要求准备样本。吸取 100 μl 标准品稀释剂放入生理盐水对照(NSB)和空白对照(B0,标准品 0 ng/L)微孔;吸取 100 μl 稀释好的 1~5 号标准品(浓度依次为 12 000、3 000、750、188 和 46.9 ng/L)至相应的微孔;吸取 100 μl 样本至相应的微孔;吸取 50 μl 缓冲液至 NSB 微孔;吸取 50 μl 蓝色酶联物至质控组(阴性对照,TA)和空白对照以外的所有微孔;吸取 50 μl 黄色抗体至 TA、NSB 和空白对照以外的所有微孔。放在约 500 r/min 摇板器上室温孵育 2 h,倒空微孔中液体,每孔加入 400 μl 冲洗溶液,再重复冲洗 2 次。最后一次冲洗完后倒干所有微孔中液体,并用吸水纸吸干剩余的液体,加入 5 μl 蓝色酶联物到 TA 孔;每孔加入 200 μl 染色剂,盖上微孔板,室温孵育 2 h。每孔加入 50 μl 终止液,立即读取吸光度;减去空白后,在 450 nm 处读取所有样本和标准品的吸光度;最后以标准品吸光度平均值减去空白值,绘制“浓度-吸光度(B/B₀)”标准曲线,依据样本平均吸光度值和标准曲线计算样本浓度。

1.4 p38 MAPK 检测:所有试剂打开前至少在室

温下平衡 30 min,所有标准品、质控和样本都做双份检测,按试剂盒要求准备试剂和样本。吸取 100 μl 配制好的 4 号缓冲液,放入 S0(标准品 0 ng/L)微孔;吸取 100 μl 1~7 号标准品至相应的微孔。吸取 100 μl 样本至相应的微孔中,轻轻敲击微孔板,使内容物混合均匀,盖上微孔板,放在约 500 r/min 摇板器上孵育 1 h,倒空微孔中液体,每孔加入 400 μl 冲洗溶液,重复冲洗 3 次。最后一次冲洗完后倒干所有微孔中液体,并用吸水纸吸干剩余的液体。除空白值外,每孔加入 100 μl 黄色抗体溶液,同上一步骤操作;除空白值外,每孔再加入 100 μl 蓝色酶联物,再同上一步骤操作;每孔加入 100 μl 染色剂,盖上微孔板,放在 500 r/min 的摇板器上孵育 30 min。每孔加入 100 μl 终止液,立即读取吸光度(减去空白值);以标准品的吸光度平均值减去空白值,然后绘制“浓度-吸光度”标准曲线,依据样本的平均吸光度值和标准曲线计算样本浓度。

1.5 MODS 评分:取患者外周静脉血时,按 1995 年全国危重病急救医学学术会议制定的 MODS 病情分期诊断标准及严重程度评分标准评分^[3]。

1.6 数据处理和统计学方法:数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较用方差分析(ANOVA),相关分析用简单相关分析法。数据用 SPSS12.0 统计软件包分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MODS 患者外周血 LTB₄ 与 p38 MAPK 含量的变化(表 1):MODS 组患者外周血 LTB₄ 含量明显低于健康对照组($P<0.05$),而 p38 MAPK 含量与健康对照组差异无显著性($P>0.05$)。

表 1 MODS 患者外周血 LTB₄ 与 p38 MAPK 变化($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Changes of serum LTB₄ and p38 MAPK

组别	例数(例)	in MODS patients($\bar{x}\pm s$)	
		LTB ₄	p38 MAPK
MODS 组	26	923.96±308.65*	193.83±106.32
健康对照组	12	2 453.31±400.93	124.36±84.50

注:与健康对照组比较;* $P<0.05$

2.2 MODS 患者 MODS 评分与外周血 LTB₄ 及 p38 MAPK 的相互关系:MODS 患者 MODS 评分与外周血 LTB₄ 呈明显负相关性($r=-0.71, P<0.001$),与 p38 MAPK 含量间无明显相关性($r=0.153, P>0.05$)。而外周血 LTB₄ 与 p38 MAPK 间无明显相关性($r=0.06, P>0.05$)。

2.3 MODS 组死亡患者与存活患者的 MODS 评分、外周血 LTB₄ 及 p38 MAPK 的比较(表 2):采血

30 d 后 MODS 患者 12 例死亡, 14 例存活。死亡患者的 MODS 评分显著高于存活患者 ($P < 0.05$), 外周血 LTB₄ 含量也显著低于存活患者 ($P < 0.05$), p38 MAPK 含量显著高于存活患者 ($P < 0.05$)。

表 2 MODS 死亡与存活患者 MODS 评分、LTB₄、p38 MAPK 变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 MODS scores, serum LTB₄ and p38 MAPK in survivor and non-survivors in MODS patients ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	MODS 评分(分)	LTB ₄ (ng/L)	p38MAPK(ng/L)
死亡组	12	17.67 ± 3.06*	444.98 ± 206.30*	272.08 ± 207.37*
存活组	14	12.14 ± 3.51	1334.51 ± 530.35	115.59 ± 57.99

注:与存活患者比较: * $P < 0.05$

3 讨论

LTB₄ 是花生四烯酸经 5-脂氧合酶(5-LO)途径代谢的一系列产物之一, 主要由中性粒细胞和巨噬细胞产生^[4]。作为一种炎性因子, 它与许多炎性疾病如支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病、类风湿性关节炎、炎性肠病及囊性纤维化等有密切关系^[5]。研究发现, LTB₄ 是目前已知最强的中性粒细胞和嗜酸粒细胞趋化因子和活化因子之一^[6]。而有抗炎作用的类固醇激素可显著降低体外循环全身炎症反应的血浆 LTB₄ 含量^[7]。本实验中, MODS 组外周血 LTB₄ 含量显著低于健康对照组, MODS 组中死亡患者外周血 LTB₄ 含量也明显低于存活患者; MODS 组患者的 MODS 评分达 (14.65 ± 4.28) 分, 病死率为 46.15%, 且 MODS 评分与 LTB₄ 含量有显著负相关性。提示 MODS 晚期或重症 MODS 患者中, 促炎因子 LTB₄ 可能因消耗过多而减少, 且病情越重, 外周血 LTB₄ 含量越低, 与一般炎症反应有所不同。

p38 MAPK 是细胞内的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是真核细胞转导细胞外信号到细胞内引起细胞反应的重要信号系统。它通过影响基因的转导和调控, 进而影响细胞的生物学行为, 如细胞增殖、分化、转化及凋亡等^[8]。紫外线照射、促炎细胞因子, 如肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-1(IL-1)、应激性刺激(H₂O₂、热休克、高渗环境、蛋白合成抑制剂, 缺血-再灌注), 以及脂多糖(LPS)与 G⁺细菌的细胞壁成分均可激活 p38 MAPK。而单核/巨噬细胞表达 TNF、IL-1、IL-6、IL-8 和环氧化酶-2(Cox-2)均依赖于 p38 MAPK。中性粒细胞 IL-8 合成、氧化爆发和弹性蛋白酶释放亦依赖于 p38 MAPK。同样, TNF 和 LPS 介导的内皮细胞 Cox-2 表达、前列腺素(PG)合成和 E-选择素的表达亦属 p38 MAPK 依赖^[9]。在一项临床研究中, 肺泡巨噬

细胞 p38 MAPK 活化水平能准确鉴别出处于急性呼吸窘迫综合征(ARDS)/MODS 高危状态下的患者, 而多项临床诊断标准却无法作出这种评估^[10]。大量的研究表明, 阻断 p38 MAPK 级联能减轻炎症反应^[11], 因此, p38 MAPK 在炎症反应中起着重要作用。p38 MAPK 为细胞内通路, 当细胞破坏时, p38 MAPK 释放到外周血中。本实验中, MODS 组与健康对照组的外周血 p38 MAPK 含量差异无显著性, 可能与样本例数少有关。而 MODS 组中死亡患者的外周血 p38 MAPK 含量显著高于存活患者, 说明 MODS 疾病晚期机体细胞破坏增多, 细胞内 p38 MAPK 释放入血增多。

综上所述, 本研究表明, 在 MODS 发病过程中, 外周血 LTB₄ 与 p38 MAPK 可作为疾病严重程度及预后的判断指标之一。通过进一步研究 LTB₄ 与 p38 MAPK 的抑制剂和受体拮抗剂来阻断和减轻炎症反应, 可以增强 MODS 的治疗效果和提高了 MODS 的生存率。

参考文献:

- Bone R C. Immunological dissonance; a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS)[J]. Ann Intern Med, 1996, 125: 680-687.
- 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.
- 王今达, 王宝恩. 多脏器功能失常综合征(MODS)病情分期诊断及严重程度评分标准[J]. 中国危重病急救医学, 1995, 7: 346-347.
- Peters-Golden M. Molecular mechanism of leukotriene synthesis; the changing paradigm [J]. Clin Exp Allergy, 1998, 28: 1059-1065.
- Brike F W, Meade C J, Anderskewitz R, et al. In vitro and in vivo pharmacological characterization of BIL284, a novel and potent leukotriene B₄ receptor antagonist [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 297: 458-466.
- Sampson S E, Costello J F, Sampson A P. The effect of inhaled leukotriene B₄ in normal and in asthmatic subjects [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155: 1789-1792.
- 高华, 毛志福, 汪长学, 等. 类固醇激素对体外循环全身性炎症反应作用的研究[J]. 中华临床医药杂志, 2002, 3: 36-40.
- Ma X L, Kumas, Gao F, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion [J]. Circulation, 1999, 99: 1685-1691.
- 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.
- Rosengart M R, Arbabi S, Nathens A, et al. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) in the ICU: potential prognostic factors [J]. Shock, 2000, 13(Suppl 12): 106-110.
- Manthey C L, Wang S W, Kinney S D, et al. SB 202190, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, is a powerful regulator of LPS-induced mRNAs in monocytes [J]. J Leuko Biol, 1998, 64: 409-417.

(收稿日期: 2004-11-25 修回日期: 2005-03-24)

(本文编辑: 李银平)