

肿瘤坏死因子- α 对多器官功能障碍综合征 家猪内皮祖细胞调控机制的影响

毛岸荣 黄河 丁科 辛海贝 种锦贵 胡剑平

【摘要】 目的 观察多器官功能障碍综合征 (MODS) 家猪内皮祖细胞 (EPC) 的数量与功能, 探讨创伤后 MODS 的发病机制。方法 将 40 头家猪按随机数字表法分为假手术组和实验组, 每组 20 头。采取失血性休克和内毒素血症的“二次打击法”制备 MODS 动物模型。分别于失血前 (T1)、内毒素注射前 (T2) 及注射后 1、24、48 h (T3、T4、T5) 取外周静脉血, 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测外周血单核细胞磷酸化 p38 丝裂素活化蛋白激酶 (p-p38MAPK) 的表达; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 浓度; 流式细胞仪检测外周血 EPC 数量。结果 实验组有 17 头家猪成功复制 MODS 模型, 动物的外周血单核细胞 p-p38MAPK 表达 (A 值) 于 T3 时达到高峰 (4.83 ± 0.52), T4、T5 时逐渐下降 (4.36 ± 0.43 、 1.93 ± 0.33), T3、T4、T5 时均显著高于 T1 时 (1.00 ± 0.22 , 均 $P < 0.01$)。实验组血浆 TNF- α 浓度 (ng/L) 于 T3 时显著高于假手术组并达高峰 (532.43 ± 52.17 比 129.03 ± 20.45 , $t = 31.163$, $P < 0.001$), 随后逐渐下降, T4、T5 时仍显著高于假手术组 (T4 : 398.93 ± 35.75 比 131.12 ± 29.53 , $t = 26.562$, $P < 0.001$; T5 : 287.48 ± 27.26 比 126.44 ± 26.96 , $t = 17.861$, $P < 0.001$)。实验组外周血 EPC 数量 ($\times 10^7/L$) 于 T3 时显著高于假手术组并达高峰 (4.832 ± 0.624 比 3.545 ± 0.363 , $t = 9.542$, $P < 0.001$), 随后逐渐下降, T4、T5 时显著低于假手术组 (T4 : 2.628 ± 0.627 比 3.442 ± 0.325 , $t = 5.043$, $P < 0.001$; T5 : 2.203 ± 0.711 比 3.471 ± 0.323 , $t = 2.972$, $P < 0.001$)。结论 在创伤性 MODS 的发生机制中, 外周血单核细胞中 p38MAPK 的磷酸化可以促使血浆中 TNF- α 浓度升高, EPC 数量下降, 可能为其机制之一。

【关键词】 多器官功能障碍综合征; p38 丝裂素活化蛋白激酶; 肿瘤坏死因子- α ; 内皮祖细胞

Modulation of endothelial progenitor cells by tumor necrosis factor- α in multiple organ dysfunction syndrome in swine Mao Anrong, Huang He, Ding Ke, Xin Haibei, Zhong Jingui, Hu Jianping. Department of General Surgery, 85 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China

Corresponding author: Hu Jianping, Email: jphugh@163.com

【Abstract】 Objective To study the modulation in number and function of endothelial progenitor cell (EPC) in multiple organ dysfunction syndrome (MODS) after trauma in swine, and to investigate its pathogenesis. **Methods** Forty pigs were divided into sham group and MODS group (each, $n = 20$). The model of MODS of "two-hit" injury, namely hemorrhagic shock and endotoxemia, was reproduced. The peripheral blood was collected before hemorrhage (T1) and endotoxin injection (T2), and 1 hour (T3), 24 hours (T4), 48 hours (T5) after endotoxin injection. Phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38MAPK) in mononuclear cell was determined by Western Blot, the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was determined with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the number of EPC was determined with flow cytometry. **Results** Model of MODS was successfully reproduced in 17 pigs. In model group, the expression of p-p38MAPK (A value) peaked at T3 (4.83 ± 0.52), and gradually declined at T4 and T5 (4.36 ± 0.43 , 1.93 ± 0.33), and the expression of p-p38MAPK at T3-T5 was significantly higher than that at T1 (1.00 ± 0.22 , all $P < 0.01$). The plasma concentration of TNF- α (ng/L) at T3 in MODS group was obviously elevated compared with that of sham group (532.43 ± 52.17 vs. 129.03 ± 20.45 , $t = 31.163$, $P < 0.001$), and it peaked at T3, it then gradually lowered, and it was significantly higher at T4 and T5 than that in sham group (T4: 398.93 ± 35.75 vs. 131.12 ± 29.53 , $t = 26.562$, $P < 0.001$; T5: 287.48 ± 27.26 vs. 126.44 ± 26.96 , $t = 17.861$, $P < 0.001$). The number of EPC ($\times 10^7/L$) was apparently increased in MODS group at T3 compared with sham group (4.832 ± 0.624 vs. 3.545 ± 0.363 , $t = 9.542$, $P < 0.001$), and it peaked at T3, then gradually decreased, and the number of EPC at T4 and T5 was significantly lower than that in sham group (T4: 2.628 ± 0.627 vs. 3.442 ± 0.325 ,

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2015.06.015

基金项目: 国家自然科学基金 (30672170)

作者单位: 200052 上海, 解放军第八五医院普外科

通讯作者: 胡剑平, Email: jphugh@163.com

$t = 5.043, P < 0.001$; T5: 2.203 ± 0.711 vs. $3.471 \pm 0.323, t = 2.972, P < 0.001$). **Conclusion** Phosphorylation of p38MAPK could increase the plasma concentration of TNF- α and decrease the quantity of EPC in MODS, which may be one of the mechanisms of MODS.

【Key words】 Multiple organ dysfunction syndrome; p38 mitogen-activated protein kinase; Tumor necrosis factor- α ; Endothelial progenitor cell

多器官功能障碍综合征(MODS)是外科重症加强治疗病房(ICU)危重患者的主要并发症,目前其发病机制尚未完全阐明,而且在临床上缺乏有效的治疗方法^[1-2]。最近人们已慢慢认识到,MODS实际是生物体对多种严重损伤导致全身性过度炎症反应的最终结果,以肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)等大量促炎因子过度释放或IL-4、IL-10等抗炎因子释放延迟为特征的炎症过度反应综合征,最终引起机体的免疫调节失衡,促使MODS的发生^[3-4]。有研究报道,在MODS发生过程中,内皮细胞不但是炎症反应的参与者,还是最先受损的靶细胞,进而导致微循环损伤,这或许是多器官功能障碍的始发因素^[5]。当组织受到损伤时,外周循环组织中的内皮祖细胞(EPC)动员与增殖能力明显变强,而且能够在组织内定向分化为内皮细胞,以代替功能障碍的内皮细胞、修复裸露血管的内皮损伤区域,参与损伤组织内新生血管的生成,提高缺血器官的功能;如果创伤后组织中EPC的分化、迁徙等功能发生严重障碍,就会导致损伤部位微循环损害加重而无法修复,甚至导致器官功能衰竭^[6-9]。

本研究通过“二次打击法”建立猪MODS模型,观察外周血单核细胞中p38丝裂素活化蛋白激酶(p38MAPK)磷酸化情况,同时检测外周血TNF- α 浓度与EPC的数量,为临床防治MODS提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组:清洁级小型雄性家猪40只,体质量(25.66 ± 3.86)kg,由上海第二军医大学动物中心提供,动物合格证号:SCXK 2013-0653。按照随机数字表法将动物分为两组:实验组(20只)采用失血性休克+内毒素注射的二次打击方法;假手术组(20只)仅实施麻醉和动静脉插管,不进行失血和内毒素注射。

1.2 家猪MODS模型制备:模型建立分为一次打击(手术创伤+失血性休克+复苏再灌注)和二次打击(内毒素血症)两个过程。在股动脉留置动脉导管以备放血;一侧股静脉插入Swan-Ganz导管,肺动脉插管后连接多道生物信号分析装置,用来监测血流动力学指标;同时行气管切开,放置9号气

管套管用来吸痰、给氧与呼吸机辅助呼吸。实施改良的Wiggers法复制失血性休克动物模型,从股动脉插管放血约30min后使平均动脉压(MAP)降至(50 ± 5)mmHg(1mmHg=0.133kPa),并维持2h,将60%失血量及2倍失血量的平衡液从静脉1~2h内回输用来复苏,回输结束后MAP需回升到伤前水平75%以上。复苏12h后从外周静脉持续滴入(24h内)内毒素(美国Sigma公司)0.5mg/kg。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 MODS诊断标准:本研究参考动物全身炎症反应综合征(SIRS)诊断的标准^[10]与动物MODS诊断标准^[11]判断MODS的发生,并计算MODS发生率。24h内发生MODS或死亡者视为复苏失败。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 血标本采集:分别于失血前(T1)、内毒素注射前(T2)及注射后1、24、48h(T3、T4、T5)取外周静脉血30mL,加入肝素抗凝,分离单核细胞;另外留取静脉肝素抗凝血10mL,离心10min后取上清液,-70℃保存备用。

1.4.2 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测外周血单核细胞磷酸化的p38MAPK(p-p38MAPK):提取外周血单核细胞总蛋白,采用BCA法测定样本总蛋白的浓度,将样品浓度调整到10g/L,并加入相应体积的5 \times 上样缓冲液,100℃变性5min,冰上冷却,按照免疫印迹杂交法步骤操作。

1.4.3 外周血TNF- α 浓度检测:采用双抗体夹心ABC-酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血浆TNF- α ,操作按试剂盒(美国Sigma公司)说明书进行。

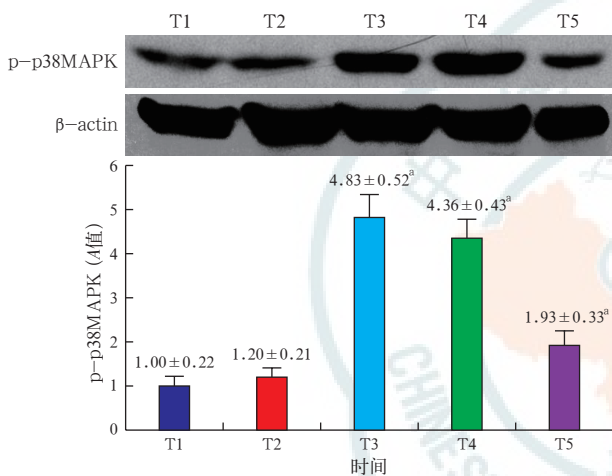
1.4.4 外周血EPC数量检测:取外周血50 μ L,离心弃上清,200 μ L磷酸盐缓冲液(PBS)重悬,加入鼠抗猪CD133、CD34和血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR-2)抗体,加入5 μ L异硫氰酸荧光素标记马抗小鼠IgG二抗避光孵育20min,用流式细胞仪进行流式分类(FACScan)。

1.5 统计学方法:采用SPSS 11.0软件进行数据处理,计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验;MODS发生率比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MODS 发生率:实验组 20 只猪中有 17 只发生 MODS,其中 2 个器官功能障碍 6 只,3 个器官功能障碍 7 只,4 个或以上器官功能障碍 4 只;另 3 只猪 24 h 内发生 MODS,视为复苏失败,予以剔除。假手术组 20 只猪均未发生 MODS。

2.2 MODS 猪外周血单核细胞 p-p38MAPK 蛋白表达 (图 1): T3 时 p-p38MAPK 表达至最高值,较 T1 时明显升高 ($P < 0.01$),随后逐渐下降,至 T5 时仍明显高于 T1 时 ($P < 0.01$)。



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, MODS 为多器官功能障碍综合征, p-p38MAPK 为磷酸化 p38 丝裂素活化蛋白激酶, β -actin 为 β -肌动蛋白, T1 为失血前, T2 为内毒素注射前, T3、T4、T5 分别为内毒素注射后 1、24、48 h;与 T1 比较, * $P < 0.01$

图 1 Western Blot 检测 MODS 家猪各时间点外周血单核细胞 p-p38MAPK 的表达

表 1 MODS 对家猪各时间点血浆 TNF- α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 动物数 (只) | TNF- α (ng/L) | | | | |
|------|---------|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| 假手术组 | 20 | 187.98 ± 22.04 | 123.86 ± 23.14 | 129.03 ± 20.45 | 131.12 ± 29.53 | 126.44 ± 26.96 |
| 实验组 | 17 | 194.94 ± 45.85 | 120.72 ± 25.73 | 532.43 ± 52.17 | 398.93 ± 35.75 | 287.48 ± 27.26 |
| t 值 | | 1.351 | 1.052 | 31.163 | 26.562 | 17.861 |
| P 值 | | 0.182 | 0.293 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |

注: MODS 为多器官功能障碍综合征, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , T1 为失血前, T2 为内毒素注射前, T3、T4、T5 分别为内毒素注射后 1、24、48 h

表 2 MODS 对家猪各时间点外周血中 EPC 数量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 时间 | 动物数 (只) | EPC 数量 ($\times 10^7/L$) | | | | |
|------|---------|----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| 假手术组 | 20 | 3.213 ± 0.443 | 3.833 ± 0.425 | 3.545 ± 0.363 | 3.442 ± 0.325 | 3.471 ± 0.323 |
| 实验组 | 17 | 3.492 ± 0.311 | 3.933 ± 0.436 | 4.832 ± 0.624 | 2.628 ± 0.627 | 2.203 ± 0.711 |
| t 值 | | 0.061 | 0.362 | 9.542 | 5.043 | 2.972 |
| P 值 | | 0.950 | 0.721 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |

注: MODS 为多器官功能障碍综合征, EPC 为内皮祖细胞, T1 为失血前, T2 为内毒素注射前, T3、T4、T5 分别为内毒素注射后 1、24、48 h

2.3 两组血浆 TNF- α 含量的比较 (表 1):两组 T1、T2 时血浆 TNF- α 含量差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); T3 时实验组血浆 TNF- α 含量较假手术组显著升高并达峰值 ($P < 0.01$),随后逐渐下降,至 T5 时仍显著高于假手术组 ($P < 0.01$)。

2.4 两组外周血 EPC 数量的比较 (表 2):两组 T1、T2 时外周血中 EPC 数量比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); T3 时实验组外周血 EPC 数量较假手术组显著升高并达峰值 ($P < 0.01$),随后逐渐下降, T4、T5 时显著低于假手术组 ($P < 0.01$)。

3 讨论

最近研究发现,在很多疾病中可以检测到外周血 EPC 的数量和功能的改变;不同炎症状态下外周血 EPC 的数量有所不同。Grisar 等^[12]研究显示,在风湿性关节炎中外周血 TNF- α 升高明显,然而 EPC 数量明显下降,抑制 TNF- α 浓度升高后,外周血 EPC 的数量、功能得到明显改善,二者之间呈明显负相关;Palange 等^[13]研究发现,在慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 中 EPC 数量明显下降;Burnham 等^[14]发现急性肺损伤 (ALI) 患者 EPC 数量明显升高;Mayr 等^[15]给 36 位志愿者分别服用小剂量内毒素 (2 ng/kg) 与安慰剂两种药物,结果发现服用小剂量内毒素后志愿者发生了 SIRS,外周血 TNF- α 浓度明显升高,而 EPC 数量下降。本实验观察到, MODS 家猪在注射内毒素后 1 h p-p38MAPK 即达到最大值,而后逐渐下降,但 48 h 时仍然高于失血前,且血浆 TNF- α 浓度也发生了类似变化。

p38MAPK 是由 Brewster 等在 1993 年研究高渗环境对真菌影响时首次发现的,次年 Han 等分离出相对分子质量为 38 000、由 360 个氨基酸组合构成的蛋白质,它是一种新的 MAPK 信号转导通路。p38MAPK 静息状态下主要散在分布于细胞质,受到启动后转移到细胞核内;细菌脂多糖 (LPS)、炎性细胞因子 TNF- α 、应激、高渗、热休克等均可激活 p38MAPK 蛋白激酶的活性,将细胞外信号传递到细胞核,同时产生细胞反应,在全身性炎症反应、失血性休克等方面发挥十分重要的作用^[16-19]。磷酸

化 MAPK 超家族分布于细胞质内,它具有丝氨酸和苏氨酸双重磷酸化的功能,是细胞内的重要信号转导通路之一。MAPK 超家族包括 4 个亚家族,即细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2)、c-Jun 氨基末端激酶 / 应激活化蛋白激酶 (JNK/SAPK)、丝裂素活化蛋白激酶 1/ 细胞外信号调节激酶 5 (BMK1/ERK5) 和 p38MAPK,其中 p38MAPK 主要对炎性细胞因子的细胞应激信号进行转导,p38MAPK 的信号转导过程为细胞凋亡信号调节激酶 1 抗体 (MEKK5) — 抗丝裂素活化蛋白激酶 3/6 (MKK3/6) — p38MAPK^[20-21]。MODS 外周血中炎性细胞因子产生的 TNF- α 使外周血 EPC 中的 p38MAPK 发生磷酸化,导致 EPC 数量和功能下降。Seeger 等^[22]等认为,导致 EPC 数量和功能下降的原因不是凋亡引起的,而是与 TNF- α 对 EPC 中 p38MAPK 的下游激酶丝裂原和应激活化激酶 -1 (AP-1) 以及转移因子环磷酸腺苷 (cAMP) 反应性元素结合蛋白 (CRE) 产生剂量、时间依赖性下降相关。在本实验观察到,内毒素注射后 1 h EPC 数量升高是由于创伤后骨髓 EPC 的动员增强,但是随着外周血 TNF- α 浓度的升高,其对 EPC 的负性作用使外周血中 EPC 的数量迅速下降,因此其数量在内毒素注射后 24 h 和 48 h 更低。

综上,通过本实验研究证实:在失血性休克、失血再灌注、内毒素等多种因素的刺激下,导致外周血单核细胞内 p38MAPK 磷酸化明显增强, TNF- α 等细胞因子的合成与分泌增强,进而导致 EPC 内的 p38MAPK 磷酸化增强,而 EPC 数量与功能随之下降,进而各器官组织的微血管损伤修复能力下降,促使 MODS 加重。

参考文献

- [1] Bone RC. The pathogenesis of sepsis [J]. *Ann Intern Med*, 1991, 115 (6): 457-469.
- [2] Hack CE, Aarden LA, Thijs LG. Role of cytokines in sepsis [J]. *Adv Immunol*, 1997, 66: 101-195.
- [3] Adrie C, Pinsky MR. The inflammatory balance in human sepsis [J]. *Intensive Care Med*, 2000, 26 (4): 364-375.
- [4] 吕艺,姜小国,王海滨,等. 卡巴胆碱对肠缺血/再灌注大鼠外周血白细胞凋亡及细胞因子表达的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2005, 17 (2): 113-116.
- [5] Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome [J]. *J Gene Med*, 2003, 5 (12): 1028-1038.
- [6] Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo [J]. *Nat Med*, 2001, 7 (9): 1035-1040.
- [7] Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. *Circulation*, 2002, 105 (25): 3017-3024.
- [8] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348 (7): 593-600.
- [9] Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23 (7): 1185-1189.
- [10] Gando S. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and endothelial cell injury [J]. *Nihon Rinsho*, 2004, 62 (12): 2244-2250.
- [11] 胡森,盛志勇,周宝桐. MODS 动物模型研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 1999, 11 (8): 504-507.
- [12] Grisar J, Aletaha D, Steiner CW, et al. Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Circulation*, 2005, 111 (2): 204-211.
- [13] Palange P, Testa U, Huertas A, et al. Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD [J]. *Eur Respir J*, 2006, 27 (3): 529-541.
- [14] Burnham EL, Taylor WR, Quyyumi AA, et al. Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172 (7): 854-860.
- [15] Mayr FB, Spiel AO, Leitner JM, et al. Effects of low dose endotoxemia on endothelial progenitor cells in humans [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 195 (1): e202-206.
- [16] 王振辉,常晓彤,付小兵,等. 不同发育阶段大鼠小肠上皮细胞 c-jun、p38 基因表达的特征及其与肠损伤修复的关系 [J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15 (2): 77-80.
- [17] 马中富,乐胜,梁艳冰,等. 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 [J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17 (4): 211-213.
- [18] 姜勇,刘爱华,秦清和,等. 丝裂原活化蛋白激酶通路对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞肿瘤坏死因子 α 基因表达的协同调节作用 [J]. *中华医学杂志*, 2002, 82 (20): 1410-1414.
- [19] 高婧,杨艳荣,梁显泉. 人肺泡 II 型上皮细胞表面抗原在急性呼吸窘迫综合征患者中的变化及地塞米松的保护作用 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2012, 19 (2): 83-85.
- [20] 毛岸荣,黄河,方国恩,等. p38 丝裂素活化蛋白激酶磷酸化对多器官功能障碍综合征肿瘤坏死因子 α 基因表达调控的影响 [J]. *中国危重病急救医学*, 2009, 21 (9): 518-520.
- [21] 李海峰,于亚欣,姜晓明,等. 血必净注射液对复苏后大鼠细胞因子和 p38 丝裂素活化蛋白激酶通路的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17 (3): 148-151.
- [22] Seeger FH, Haendeler J, Walter DH, et al. p38 mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells [J]. *Circulation*, 2005, 111 (9): 1184-1191.

(收稿日期:2015-01-30) (本文编辑:李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对论文中实验动物描述的有关要求

在医学论文的描述中,凡涉及到实验动物应符合以下要求:① 品种、品系描述清楚;② 强调来源;③ 遗传背景;④ 微生物学质量;⑤ 明确体质量;⑥ 明确等级;⑦ 明确饲养环境和实验环境;⑧ 明确性别;⑨ 有无质量合格证明;⑩ 有对饲养的描述(如饲料类型、营养水平、照明方式、温度、湿度要求);⑪ 所有动物数量准确;⑫ 详细描述动物的状况;⑬ 对动物实验的处理方式有单独清楚的交代,符合动物伦理学标准;⑭ 全部有对照,部分可采用双因素方差分析。