

· 烧伤后炎症反应 ·

严重烧伤大鼠肝脏 p38 丝裂原活化蛋白激酶对肿瘤坏死因子 α 表达的调控及其在肝损伤中的作用

陈旭林 夏照帆 韦多 贲道锋 王永杰 汪昌荣 邓廿庆

【摘要】 目的 观察大鼠严重烧伤后肝脏 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 对肿瘤坏死因子 (TNF)α 表达的调控及其在肝损伤中的作用。方法 将健康成年雄性 SD 大鼠随机分为假伤组; 烧伤 + SB203580 组; 30% TBSA Ⅲ度烧伤 (以下称烧伤) 后 15 min 和 12 h 静脉注射 p38MAPK 的特异性抑制剂 SB203580 (10 mg/kg); 烧伤对照组; 同前致伤后给予等量等渗盐水, 每组 8 只。测定 3 组大鼠伤后 24 h 血清天冬氨酸转氨酶 (AST) 和丙氨酸转氨酶 (ALT) 活性的变化, 并分别采用实时逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 法和蛋白印迹 (Western blot) 法检测肝脏 TNF-α mRNA 及 p38MAPK、磷酸化 p38MAPK 的表达水平。结果 烧伤对照组大鼠血清 AST 和 ALT 活性及肝脏 TNF-α mRNA 的表达水平均显著高于假伤组 ($P < 0.05$ 或 0.01); 烧伤 + SB203580 组此 3 项指标均显著低于烧伤对照组 ($P < 0.05$ 或 0.01), 但与假伤组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。3 组大鼠肝脏 p38MAPK 表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 其磷酸化 p38MAPK 表达水平之比——假伤组: 烧伤对照组: 烧伤 + SB203580 组为 1.00: 3.90: 1.10, 烧伤 + SB203580 组与假伤组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 与烧伤对照组比较明显偏低 ($P < 0.01$)。结论 大鼠严重烧伤后, 肝脏中活化的 p38MAPK 促进了 TNF-α mRNA 的表达, 并参与了肝损伤的发生。

【关键词】 烧伤; p38 丝裂原活化蛋白激酶类; 肿瘤坏死因子 α; 肝; 信号转导

The modulating role of p38 mitogen-activated protein kinase in the expression of tumor necrosis factor-α in hepatic cells and its role in hepatic injury in severely burned rats CHEN Xu-lin*, XIA Zhao-fan, WEI Duo, BEN Dao-feng, WANG Yong-jie, WANG Chang-rong, DENG Nian-qing. *Department of Burns, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, P. R. China
Corresponding author: XIA Zhao-fan, 200433, Burn Center of PLA, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Email: xiazhaoan@hotmail.com, Tel: 021-25070599, FAX: 021-65589829

【Abstract】 Objective To investigate The modulating role of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in the expression of tumor necrosis factor-α in hepatic cells and its role in hepatic injury in severely burned rats. Methods Twenty-four adult healthy male SD rats were randomly divided into three groups (8 rats in each group): sham group, burn group, and burn with SB203580 group. A rat model of full-thickness burn injury covering 30% total body surface area (TBSA) was reproduced. The specific inhibitor of p38MAPK (SB203580 in 10 mg/kg) was given to the rats in the burn with SB203580 group at 15 minutes and 12 hours after burn. The serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were measured at 24 postburn hours (PBHs). The TNF-α mRNA expression in the liver was determined by real-time reverse transcription polymerase chain reaction, and the expression levels of p38MAPK and phospho-p38 MAPK in the liver were determined by Western blot analysis. Results The serum levels of AST and ALT, and the expression of TNF-α mRNA in liver cells were significantly higher in burn group than those in sham and SB203580 groups ($P < 0.05$ or 0.01), but there was no difference between the two latter groups. It was indicated by Western blot results that there was no difference of p38 MAPK expression in rat liver among the three groups ($P > 0.05$). The phospho-p38MAPK expression ratio among sham, burn and burn with SB203580 groups was 1.00: 3.90: 1.10. The phospho-p38MAPK expression was signifi-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271340); 国家高技术研究发展计划资助项目 (2001AA216041); 全军医学科学技术研究“十五”计划指令性课题资助项目 (01L055); 上海市卫生系统百名跨世纪优秀学科带头人培养计划资助项目 (97BR046); 安徽省卫生厅临床医学重点学科技术进步专项课题资助项目 (2004Z020); 安徽省教育厅自然科学研究计划资助项目 (2004KJ207)

作者单位: 230022 合肥, 安徽医科大学第一附属医院烧伤科 (陈旭林、王永杰、汪昌荣); 第二军医大学长海医院全军烧伤中心 (夏照帆、韦多、贲道锋); 安徽医科大学科技处 (邓廿庆)

通信 (讯) 作者: 夏照帆, 200433, 第二军医大学长海医院全军烧伤中心, Email: xiazhaoan@hotmail.com, 电话: 021-25070599, 传真: 021-65589829

学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组大鼠血清 AST 和 ALT 活性及肝脏 TNF- α mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (个)	AST (U/L)	ALT (U/L)	TNF- α mRNA
假伤组	8	75 \pm 40	30 \pm 14	1.0 \pm 0.3
烧伤对照组	8	321 \pm 127 [*]	127 \pm 57 [*]	5.5 \pm 2.0 [*]
烧伤 + SB203580 组	8	159 \pm 82 [△]	63 \pm 34 [△]	1.7 \pm 0.4 [△]

注:与假伤组比较, * $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$; 与烧伤对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2. 肝脏 TNF- α mRNA 的表达情况: 根据 $2^{-2\Delta\Delta Ct}$ 的计算方法, 将假伤组大鼠肝脏 TNF- α mRNA 表达水平设定为 1。烧伤对照组大鼠肝脏 TNF- α mRNA 的表达水平显著高于假伤组 ($P < 0.01$); 烧伤 + SB203580 组的表达水平显著低于烧伤对照组 ($P < 0.01$), 但与假伤组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

3. 肝脏 p38MAPK 和磷酸化 p38MAPK 的表达情况: (1) Western blot 检测结果显示, 3 组大鼠肝脏的 p38MAPK 表达情况相似 (图 1)。图像分析结果显示, 其 A 值之比——假伤组: 烧伤对照组: 烧伤 + SB203580 组为 1.00: 1.03: 0.98, 3 组之间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 (2) Western blot 检测结果显示, 烧伤对照组大鼠肝脏磷酸化 p38MAPK 表达水平较假伤组明显升高, 而烧伤 + SB203580 组表达水平则较烧伤对照组低 (图 1)。图像分析结果显示, 其 A 值之比——假伤组: 烧伤对照组: 烧伤 + SB203580 组为 1.00: 3.90: 1.10, 烧伤 + SB203580 组与假伤组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 与烧伤对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

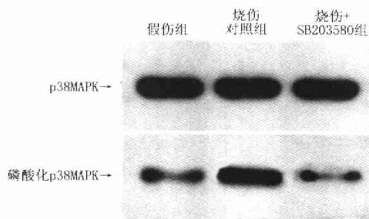


图 1 3 组大鼠肝脏 p38MAPK 和磷酸化 p38MAPK 的表达情况

Fig 1 Expression of p38MAPK and phospho-p38MAPK in liver of the rats in the three groups

讨 论

严重烧伤后常常出现全身多脏器功能损害, 对这些并发症的处理直接关系到其临床治疗效果。严重烧伤所引起的肝损害不仅直接导致肝脏屏障功能减弱, 造成肠道细菌和内毒素移位入血, 启动全身炎症反应, 而且会引起肝脏的蛋白合成能力和解毒功能下降, 与其他脏器损害和功能不全的发生发展密切相关, 影响其预后^[5]。

MAPK 是细胞内重要的信号转导通路, 广泛分布于细胞胞浆内, 可将细胞外刺激转导到胞核内, 在细胞增殖、分化和应激的调控中起重要作用。该家族信息传递的共同特征是采用高度保守的 3 级激酶级联传递信号: 细胞外刺激通过某些环节使丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAPKKK) 活化, 进而激活丝裂原活化蛋白激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK), 然后再通过 2 位点 [即苏氨酸 (T) 和酪氨酸 (Y)] 同时磷酸化激活 MAPK。激活的 MAPK 即可使转录因子、细胞骨架相关蛋白、酶类等多种底物发生磷酸化, 从而调节多种细胞生理功能。目前已在哺乳动物体内克隆和鉴定了细胞外信号调节激酶 (ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)/应激激活蛋白激酶 (SAPK)、p38MAPK 和 ERK5/BMK1 (big MAP kinase-1) 等 MAPK 亚族。其中 p38 是 MAPK 家族最重要的成员之一, 在介导炎症反应中起着重要作用。

笔者以往的研究表明, 严重烧伤后 p38MAPK 出现明显活化^[2]。本研究结果再次证实了此点。目前认为, 导致严重烧伤后 p38MAPK 活化的因素主要有以下两个方面: 一是严重烧伤后肠黏膜屏障功能减弱, 肠道的细菌和内毒素移位入血, 而内毒素是 p38MAPK 活化的重要因素之一; 除内毒素外, 伤后由于缺血再灌注损伤, 氧自由基产生增多, 而氧自由基是直接活化 p38MAPK 的另一个重要因素^[2]。

SB203580 是 p38MAPK 信号通路的特异性抑制剂, 主要作用于可结合腺苷三磷酸 (ATP) 的活性位点 T106, 使 p38MAPK 失去与 ATP 结合的能力, 从而使 p38MAPK 失去激酶活性。本研究结果显示, 烧伤对照组大鼠伤后 24 h 血清 AST 和 ALT 较假伤组显著升高, 给予 SB203580 能抑制这种升高。这一结果提示, p38MAPK 信号转导通路参与了严重烧伤后急性肝损伤的发生。

在严重烧伤后肝损伤的发生过程中, 有许多促

