

血红素氧合酶-1 及 p38 丝裂原活化蛋白激酶在脓毒症患者血清中的表达及意义

青岛市市立医院 朱建昌 徐瑜 王雪春 任贝贝*, 青岛 266000

摘要 目的:观察脓毒症患者血清中血红素氧合酶(HO)-1 及 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)表达的变化,探讨其在病程进展及预后中的意义。方法:选取脓毒症患者 45 例,根据预后将其分为存活组(31 例)及死亡组(14 例),另选取同期健康体检者 50 例作为对照组。通过逆转录聚合酶链反应和 Western Blot 技术分别检测 3 组血清 HO-1 及 p38 MAPK 的表达水平。结果:与对照组比较,死亡组与存活组患者的血清 HO-1 mRNA 及蛋白表达均明显上升($P < 0.01$),且死亡组高于存活组($P < 0.05$)。死亡组与存活组患者的 p38 MAPK 蛋白表达均明显高于对照组($P < 0.01$),且死亡组明显高于存活组($P < 0.05$)。结论:脓毒症患者血清 HO-1 和 p38 MAPK 的 mRNA 及蛋白表达明显高于对照组,HO-1 和 p38 MAPK 表达水平可提示病情严重程度及预后。

关键词 脓毒症; 血红素氧合酶-1; p38 丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号 R631+.2

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzzz20200311

脓毒症发病机制十分复杂,其疾病进程与细菌内毒素、炎症介质、免疫功能紊乱和基因多态性等多方面有关^[1]。本文检测脓毒症患者血清中的血红素氧合酶(HO-1)及 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)表达,探讨炎症因子和信号通路在脓毒症发病过程中的作用及其细胞内机制。

资料与方法

一般资料 选取 2018 年 1 月~2019 年 1 月青岛市市立医院急诊内科脓毒症患者 45 例,所有患者均符合 2016 年脓毒症诊断标准^[1],临床资料真实完整。排除伴有原发性心、肝、肺及肾等器官重大疾病;免疫功能缺陷者,如自身免疫性疾病、恶性肿瘤及应用免疫抑制剂者;存在精神障碍者。本研究经医院伦理委员会批准,患者或家属知情并签署同意书。根据入院 28d 内患者死亡与否分为死亡组(14 例)及存活组(31 例),另选取同期健康体检者 50 例作为对照组。3 组年龄和性别构成比方面比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 1。

方法 ①对照组于体检当日测量体温(T)、心率(HR)及呼吸频率(R),脓毒症患者于入院 12 h 内测量 T、HR 及 R;②各组于体检当日或入院次日清晨空腹抽取静脉血 10 mL,其中 5 mL 经 3 000 r/min 离心 10 min,取上清,保存于 -70℃ 冰箱用做 Western Blot 检测,检测血清中 HO-1(美国 SANTA CRUZ 公司)和 p38 MAPK(美国 SANTA CRUZ 公司)的蛋白表达水平,山羊抗小鼠 IgG(北京康为世纪生物科技

有限公司)作为二抗,采用数字凝胶成像系统拍照并分析目的蛋白的表达。另外 5 mL 用肝素抗凝,取有核细胞进行 mRNA 检测。提取总 RNA:抗凝血液标本试管中加 5 倍体积的红细胞裂解液,混匀,4℃ 放置 15 min,以 2 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,1 × PBS 液洗 2 次,离心获得有核细胞沉淀物。取上述沉淀物加入 Trizol 试剂(美国,Invitrogen 公司)1 mL,依次经氯仿、异丙醇提取总 RNA。采用紫外分光光度计测定波长 260、280 吸光度(A)值,并计算 A260/A280,所有样本的 A260/A280 均在 1.7 ~ 2.6 之间。用凝胶成像分析仪分析结果;③逆转录聚合酶链反应(RT-PCR):按逆转录试剂盒(日本, TAKARA 公司)要求的标准进行。反应条件为:65℃ 5 min,4℃ 5 min。HO-1 和内参照 GAPDH 引物如下。HO-1 上游引物:5'- CAGTGCCACCAAGT-TCAA-3',下游引物:5'- TAAGGACCCATCGGAGAA-3',扩增片段长度分别为 299bp;GAPDH 上游引物:5'-TCATGGGTGTGAACCATGAGAA-3',下游引物:5'-GGCATGGACTGTGCTCATGAG-3',扩增片段长度为 146bp。PCR 条件为 98℃ 10 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,共 38 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。反应产物在 15 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳,将每份标本的目的基因扩增条带与内参照扩增条带的平均 A 比值作为目的基因 mRNA 含量的相对值。

统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计学软件,符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐性者两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

*通信作者:任贝贝, E-mail: candy86ren@sina.cn

结 果

生命体征 存活组和死亡组 HR 和 R 明显高于

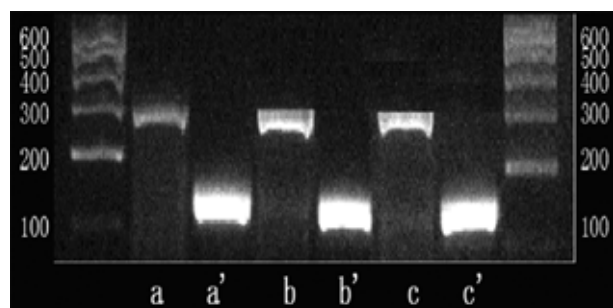
对照组(均 $P < 0.05$),但 2 组之间无明显差异(均 $P > 0.05$);死亡组与存活组体温高于对照组,且死亡组高于存活组(均 $P < 0.05$),见表 1。

表 1 3 组一般情况比较

组别	例	性别(例)		年龄 (岁)	T (℃)	HR (次/min)	R (次/min)
		男	女				
对照组	50	26	24	48.08 ± 10.64	36.66 ± 0.43	79.56 ± 5.28	17.00 ± 1.50
存活组	31	17	14	48.55 ± 10.51	37.81 ± 0.52 *	105.84 ± 7.63 *	19.87 ± 2.31 *
死亡组	14	7	7	51.71 ± 7.60	38.12 ± 0.33 * [△]	108.43 ± 9.72 *	20.00 ± 2.32 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与存活组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

血清 HO-1 的 mRNA 水平 死亡组与存活组血清 HO-1 mRNA 的表达较对照组明显升高($P < 0.01$),且死亡组高于存活组(均 $P < 0.05$),见图 1、表 2。



注:a)对照组 HO-1 扩增图像;a')对照组 GAPDH 扩增图像;b)存活组 HO-1 扩增图像;b')存活组 GAPDH 扩增图像;c)死亡组 HO-1 扩增图像;c')死亡组 GAPDH 扩增图像

图 1 HO-1 PCR 扩增图像

表 2 3 组血清 HO-1 mRNA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例	HO-1
对照组	50	0.601 ± 0.167
存活组	31	0.730 ± 0.142 *
死亡组	14	0.826 ± 0.171 * [△]

注:与对照组比较, * $P < 0.01$;与存活组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

血清 HO-1 和 p38 MAPK 蛋白表达水平 与对照组比较,死亡组与存活组患者血清 HO-1 和 p38 MAPK 蛋白表达及印迹图像分析均明显增高,且死亡组明显高于存活组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),见图 2、表 3。

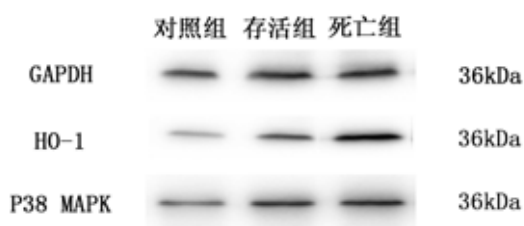


图 2 3 组血清 HO-1 和 p38 MAPK 蛋白表达

表 3 3 组血清 HO-1 及 p38 MAPK 的蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例	HO-1 蛋白带 灰度峰值	p38 MAPK 蛋白带 灰度峰值
对照组	50	13.55 ± 3.99	13.96 ± 4.02
存活组	31	16.84 ± 3.23 *	17.48 ± 3.99 *
死亡组	14	19.48 ± 3.25 * [△]	20.02 ± 2.56 * [△]

注:与对照组比较, * $P < 0.01$;与存活组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

讨 论

脓毒症是宿主对感染的反应失调,产生危及生命的器官功能损害。脓毒症发病率逐年升高,预后差,死亡率高。其中,对心机的损伤程度直接影响患者预后,其损伤机制与血液动力学、心肌细胞代谢、细胞因子调节、基因调控及自主功能等多方面有关^[2],目前尚无定论。最新研究表明,脓毒症的疾病进展伴随着全身炎症反应及代偿性抗炎反应综合征的发生发展^[3]。

HO 是血红素降解的限速酶,广泛存在于各组织。作为一种关键生物分子,参与适应和防御氧化应激等细胞应激反应。血红素氧合酶有三种同工酶:HO-1、HO-2、HO-3,由不同的基因所编码,其中 HO-1 属于诱导型,在氧化应激、缺血再灌注、紫外线、低氧、热休克、重金属及细胞因子等诱导下表达明显增加,而 HO-2、HO-3 为结构型,表达相对稳定。近年来相关研究发现 HO-1 是心肌的一种保护酶^[4],在对抗心肌重构中发挥抗氧化、抗细胞凋亡、抗感染、信号转导、衰减炎症应答等重要作用。HO-1 及其产物是多效性的细胞保护效应分子,参与血管内皮炎症反应及氧化应激,是机体的内源性抗损伤机制之一。此外,MAPK 介导的信号转导途径是细胞内多种细胞增殖信息传递的共同通路,p38 是 MAPK 家族的重要细胞外信号调节激酶。相关实验^[5]发现连续性激活 p38 MAPK 通路将引起 HO-1 靶基因活性提高,p38 MAPK 也参与了 HO-1 下游的激活。p38 MAPK 信号通路通过调节氧化应

激、炎症介质的释放、细胞凋亡等病理过程来调控脓毒症病情进展^[6]。许多药物通过抑制 p38 MAPK 通路的活性而发挥器官保护作用。Zhang 等^[7]发现,乌司他丁的应用可以抑制 p38 MAPK 通路的活化,减少肺泡中 TNF- α 等炎症因子的产生,从而保护呼吸系统功能;Lv^[8]也发现,糖皮质激素联合透明质酸治疗可抑制 p38 MAPK 的磷酸化,缓解细菌粘多糖诱导产生的大鼠肺损伤。

本实验发现脓毒症患者血清 HO-1 表达明显高于健康人群,其中死亡组高于存活组,这可能是脓毒症对 HO-1 强诱导作用,其诱导作用与疾病严重程度相关。我们推测心肌缺血缺氧从而引发炎症介质的释放,进而导致 HO-1 的表达增加,进一步对抗心肌损伤。本研究还发现脓毒症患者 p38 MAPK 的表达随疾病严重程度明显增高。我们推测 p38 MAPK 信号通路通过一定机制调控脓毒症的发展,并可能在一定程度上预测疾病预后。但其具体病理生理过程有待进一步研究。

参考文献

- 1 Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international

consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. JAMA 2016;315(8):801-810.

- 2 王凤新,张博,白秀萍.脓毒症心肌损伤机制研究进展[J].内科急危重症杂志,2018,24(5):437-440.
- 3 Kamisoglu K, Haimovich B, Calvano SE, et al. Human metabolic response to systemic inflammation: assessment of the concordance between experimental endotoxemia and clinical cases of sepsis/SIRS [J]. Crit Care, 2015, 19(1):71.
- 4 李湛.血红素氧合酶 1 的生物性特征及其在冠心病防治中的作用[J].中国动脉硬化杂志,2016,24(1):92-96.
- 5 Asaduzzaman M, Wang Y, Thorlacius H. Critical role of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in septic lung injury [J]. Crit Care Med, 2008, 36(2):482-488.
- 6 张琪,山峰. p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路在脓毒症器官功能障碍中的作用[J].中国细胞生物学报,2018,40(2):291-296.
- 7 Zhang XY, Liu FQ, Liu HY, et al. Urinary trypsin inhibitor attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by blocking the activation of p38 mitogen-activated protein kinases [J]. Inflamm Res, 2011, 60(6):569-575.
- 8 Lv Q. Glucocorticoid combined with hyaluronic acid enhances glucocorticoid receptor activity through inhibiting p38 MAPK signal pathway activation in treating acute lung injury in rats [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(18):3920-3929.

(2019-03-22 收稿 2019-07-29 修回)

(上接第 217 页)

的一种方式^[7,8],它秉承了连续性和间歇性血液透析的优点,采用低血流量持续 8~12 h,对于治疗急性肾损伤及多器官功能障碍、急性中毒的重症患者具有一定的疗效。

2 组患者治疗前、后血液动力学指标比较,差异无明显统计学意义($P > 0.05$)。T₁ 时,2 组的 HR 升高、MAP、CO、CI 降低;与 T₁ 比较, T₄ 时 MAP 明显升高,HR 降低, T₅ 时 CO、CI 增高。治疗后 2 组的 APACHE II 评分均低于治疗前。2 组患者治疗前、后生化指标差值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。2 组患者的治愈率比较差异也不明显。说明 SLED 和 CBP 二种方法没有突出的区别,血液动力学方面均相对稳定,均明显提高了患者的疗效及预后^[9]。但是 SLED 治疗危重症患者更经济、便捷。

参考文献

- 1 张引,赵希洋,刘阳,等.连续性肾脏替代治疗与间歇性血液透析治疗重症急性肾衰的存活率及预后效果对比[J].中国急救复苏

与灾害医学杂志,2018,13(9):852-854.

- 2 姜维.联机血液透析滤过联合血液灌流对终末期肾病患者血 CT-GF、NT-ProBNP 水平的影响[J].内科急危重症杂志,2017,23(5):405-406.
- 3 郑明楠,吴华.三种血液净化方式对尿毒症患者外周血清中毒素水平的影响[J].医学综述,2018,24(23):4781-4784.
- 4 顾凤娟,隋晓露,许云鹏,等.不同模式连续性血液净化对多器官功能障碍综合征患者的影响[J].中华实用诊断与治疗杂志,2018,32(9):883-886.
- 5 张远鹏.连续性血液透析治疗糖尿病肾病酮症酸中毒合并急性肾损伤的作用[J].内科急危重症杂志,2016,22(1):58-59.
- 6 郑席志,段瑞.维持性血液透析主要照顾者反应和应对方式的相关性研究[J].中国血液净化,2018,17(12):850-853.
- 7 贺静,姜丹,程小云.连续性血液净化与间歇性血液透析治疗重症急性肾衰竭的疗效比较[J].湖南师范大学学报(医学版),2017,14(5):110-112.
- 8 孟祥忠,魏琼,朱宇,等.连续性肾脏替代疗法治疗重症患者多脏器功能衰竭[J].中国临床研究,2019,32(6):759-762.
- 9 黎璞,吴巍,孙陈波,等.血液透析滤过联合乌司他丁对糖尿病酮症酸中毒患者炎症因子的作用[J].内科急危重症杂志,2018,24(3):217-219.

(2019-03-26 收稿 2019-07-29 修回)