

凝血酶敏感蛋白-1介导脓毒症肝损伤中 ERK 通路的作用研究

缪玉兰¹⁾, 夏照帆²⁾, 王广庆²⁾, 付晋凤¹⁾

(1) 昆明医科大学第二附属医院烧伤科, 云南昆明 650101; 2) 第二军医大学长海医院烧伤科, 上海 200433)

[摘要] **目的** 观察凝血酶敏感蛋白-1 (TSP-1) 介导的脓毒症肝损伤中细胞外调节激酶 (ERK) 通路的作用。 **方法** 选用雄性 Balb/c 小鼠随机分为 4 组 (n=5): 假手术 (sham) 组、CLP 对照组、阴性片段对照组、有效片段组。利用流体尾静脉注射法予以 TSP-1 特异性的 siRNA 片段进行 RNA 干扰 (RNAi), 下调肝脏 TSP-1 表达, 采用盲肠结扎穿刺 (CLP) 制作脓毒症模型, 检测肝脏 TSP-1 表达变化, 检测血清转氨酶和 TNF- α 含量, 检测肝脏 ERK 蛋白表达变化。 **结果** 有效片段组中肝脏 TSP-1 的表达明显下调, 验证 RNAi 有效。与假手术组相比, CLP 组和阴性对照组转氨酶 ALT 和 AST 含量、TNF- α 含量明显升高 ($P < 0.05$), 磷酸化 ERK 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 予以有效片段进行 RNAi 后, ALT 和 AST 含量、TNF- α 含量明显降低 ($P < 0.05$), 磷酸化 ERK 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$)。 **结论** TSP-1 参与介导脓毒症肝损伤, 导致血清转氨酶及 TNF- α 含量升高, ERK 通路的抑制是其分子机制之一。

[关键词] 凝血酶敏感蛋白-1; 脓毒症; 肝损伤; ERK; RNA 干扰

[中图分类号] R631 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 05-0028-05

Role of ERK Pathway in Septic Liver Injury Induced by Thrombospondin-1

MIAO Yu-lan¹⁾, XIA Zhao-fan²⁾, WANG Guang-qing²⁾, FU Jin-feng¹⁾

(1) Dept. of Burn, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 2) Dept. of Burn, Changhai Hospital, The 2nd Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To observe the role of extracellular regulated protein kinases (ERK) pathway in septic liver injury induced by the thrombospondin-1 (TSP-1). **Methods** Male Balb/c mice were randomly divided into four groups (n = 5 per group): sham, CLP control, siRNA negative fragment control, and siRNA effective fragment group. TSP-1 protein expression in liver was downregulated by hydrodynamic tail vein injection of the fragments of siRNA specific for TSP-1. The model for sepsis was developed by cecal ligation and puncture (CLP). TSP-1 expression in liver was detected. Serum aminotransferase and serum TNF- α contents were detected. The change of liver ERK protein was detected. **Results** In siRNA effective fragment group, the expression of TSP-1 in liver was obviously decreased. This confirmed that RNAi effectively downregulated the expression of TSP-1. In comparison with sham group, serum ALT, AST and TNF- α contents were significantly increased as well as the expression of liver phospho-ERK was decreased in CLP and siRNA negative fragment groups. After RNAi, all detection results were inverse. **Conclusions** TSP-1 may induce septic liver injury. This results in increased serum aminotransferase and serum TNF- α contents. The suppression of ERK pathway is one of the molecular mechanisms.

[Key words] Thrombospondin-1; Sepsis; Liver injury; Extracellular regulated protein kinases; RNA interference

[基金项目] 云南省卫生科技计划基金资助项目 (2009NS086)

[作者简介] 缪玉兰 (1975~), 女, 云南弥勒县人, 医学博士, 主治医师, 主要从事烧伤脓毒症基础研究及烧伤临床工作。

[通讯作者] 夏照帆. E-mail: xiazhaofan@163.com

多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) 是外科危重病救治难题, 各种外科感染引起的脓毒症是其重要病因, 多器官损伤中肝脏常常受累, 在细胞能量代谢损害时肝脏损害发生最早、程度最重, 肝功能不全是脓毒症发展为 MODS 的标志之一^[1]. 上世纪 70 年代 Baenziger 从凝血酶刺激后的血小板中分离得到凝血酶敏感蛋白-1 (thrombospondin-1, TSP-1), 作为第一个被发现的内源性多肽类血管新生抑制剂, 其抗血管新生功能明确, 在抗肿瘤治疗中前景广阔, 随着研究深入有学者^[2]发现 TSP-1 在肾脏缺血/再灌注 (I/R) 损伤中表达增高, TSP-1 不仅是损伤的标志而且还是损伤的介质. RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是由小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 针对目的基因的靶 mRNA 进行特异性切割、降解, 引起转录后基因沉默, 阻断目的基因活性, 从而不能翻译合成相应蛋白质^[3], RNAi 作为新型基因封闭技术, 逐渐成为研究靶基因、靶蛋白的有力手段. 本实验拟应用 RNAi 下调肝脏 TSP-1 表达, 探讨后者在脓毒症肝损伤中的作用, 并从细胞外调节激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 通路变化的角度探讨其分子机制.

1 材料与方法

1.1 动物模型

参照文献^[4]利用流体尾静脉 (hydrodynamic tail vein, HTV) 注射法输入 siRNA 片段: 体重 18~22 g 的健康成年雄性 Balb/c 小鼠 (第二军医大学实验动物中心) 禁食 16 h, 将 40 μ g 的 siRNA (Qiagen 公司), 即阴性对照片段、有效片段, 分别溶于 PBS 1.5 mL, 经小鼠尾静脉 5~7 s 内推入, 假手术组和 CLP 对照组同法注射 PBS 1.5 mL. 之后参照文献^[5]利用盲肠结扎穿刺 (cecal ligation and puncture, CLP) 制作脓毒症模型: 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔麻醉, 开腹并牵出盲肠, 于盲肠和升结肠交汇处结扎盲肠, 18 号针头贯穿盲肠 1 次, 挤压使盲肠内容物流出, 回纳盲肠并关腹, 背部皮下注射生理盐水 1 mL 补液, 完成制模, 假手术组予开腹, 牵出盲肠不行结扎穿刺, 之后回纳并关腹.

1.2 分组及取材

随机分为 4 组 ($n=5$): 假手术 (sham) 组、CLP 对照组、阴性对照组、有效片段组. 制模后 6 h 同前麻醉, 开胸经右心房抽静脉血约 0.7 mL, 开

腹剪断腹腔血管放血致死, 取肝左叶于液氮冷冻下研磨成粉分装置于 -80°C 冰箱待用. 血标本于室温自然凝血, 予以 2 500 r/min 离心 5 min, 取上层血清置于 -20°C 冰箱备检.

1.3 肝组织 TSP-1 mRNA 的检测

采用 Trizol 法提取总 RNA, 进行核酸定量并配平, 按照 M-MLV (Promega 公司) 说明书进行逆转录合成 cDNA 模板, 建立 20 μ L PCR 反应体系: cDNA 0.5 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, dNTP 1.9 μ L, 上、下游引物 (上海生工生物技术公司) 各 0.4 μ L, Taq 酶 0.3 μ L (TaKaRa 公司), DEPC 水 14.5 μ L. TSP-1 引物: sense 5'TCTCAGGAACAAAGGCTGCT 3', T_m 57.80 $^{\circ}\text{C}$; antisense 5'AGAGCAGGAGGTC-CACTCAG 3', T_m 61.90 $^{\circ}\text{C}$, 目的片段 501 bp. β -actin 引物:sense 5'CGGCCAGGTCATCACTATTG 3', T_m 59.85 $^{\circ}\text{C}$; antisense 5'TCCTTCTGCATCCTG-TC AGC 3', T_m 59.85 $^{\circ}\text{C}$, 目的片段 216 bp. TSP-1 反应条件如下: 预变性: 94 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 变性: 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 退火: 55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 延伸: 72 $^{\circ}\text{C}$, 90 s (变性、退火、延伸进行 35 个循环); 总延伸: 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min. 内参 β -actin 退火 61 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 进行 25 个循环, 余步同前. 取 PCR 产物及各自内参 β -actin 混匀进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并摄影, 图片用 Fluors Mutilmager 图像分析仪分析, 以产物及其 β -actin 条带光密度值的比值来表示各目的基因 mRNA 表达的相对强度.

1.4 肝组织 TSP-1 蛋白的检测

采用 Western blot 方法. 全细胞裂解法提取总蛋白, BCA 法定量, 各组取 50 μ g 样品蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 按 2.5% 浓缩胶、7.5% 分离胶制胶, 上样电泳 (50 V, 约 30 min, 待蛋白浓缩成线, 换为 100 V, 约 100 min), 取分离胶进行全湿法电转移 (100 V, 电转 80 min), 转入硝酸纤维素膜 (Pall corporation 公司). 剪下目的条带放入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温下封闭 2 h, 洗膜, 加入相应一抗兔抗鼠 TSP-1 多克隆抗体 (abcam 公司, 按 1:200 稀释) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜后与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (Pierce 公司, 按 1:10 000 稀释) 和 ECL 显色液 (Pierce 公司) 反应, 显影、成像、扫描.

1.5 肝功能检测

利用自动生化仪测定血清转氨酶 ALT 和 AST 含量.

1.6 血清 TNF- α 检测

采用 ELISA 法检测血清 TNF- α 含量.

1.7 肝组织 ERK 蛋白检测

采用 Western blot 方法. 按 5%浓缩胶、10%分离胶制胶. 相应一抗 phospho-ERK 抗体、ERK 抗体为兔抗鼠多克隆抗体 (Cell Signaling Technology 公司), 均按 1:1 000 稀释; 内参 β -actin-HRP 抗体为鼠抗鼠单克隆抗体 (Sigma 公司), 按 1:25 000 稀释. 余步同前述 TSP-1 蛋白的检测.

1.8 统计学处理

结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示. 进行方差齐性检验, 采用单因素方差分析比较组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 RNA 干扰效果验证

2.1.1 肝组织 TSP-1 mRNA 的表达 各组扩增产物条带清晰, 未见非特异性条带及引物二聚体形成, 扩增成功 (见图 1). 有效片段组 TSP-1 mRNA 表达较 CLP 组和阴性对照组明显抑制 ($P < 0.05$), 与假手术组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 从 mRNA 水平验证该有效片段确能下调肝组织 TSP-1 表达.

2.1.2 肝组织 TSP-1 蛋白检测 有效片段组 TSP-1 蛋白表达较 CLP 组和阴性对照组明显抑制 ($P < 0.05$), 见图 2, 与假手术组相比差异无显著性 ($P > 0.05$), 从蛋白水平验证该有效片段确能下调肝组织 TSP-1 表达.

2.2 血清转氨酶及血清 TNF- α 测定结果

与假手术组相比, CLP 组和阴性对照组 ALT 和 AST 含量、TNF- α 含量均明显升高 ($P < 0.05$), 予以有效片段进行 RNAi 后, 与 CLP 组和阴性对照组相比, 3 者均明显降低 ($P < 0.05$), 见表 1.

2.3 肝脏 ERK 蛋白表达

蛋白条带的平均光密度值表示其含量, 以 β -actin 为基准比较非磷酸化 ERK 蛋白相对表达, 发现各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3; 再以非磷酸化 ERK 为基准比较 phospho-ERK 蛋白相对表达, 与假手术组相比, CLP 组和阴性对照组 phospho-ERK 表达明显降低 ($P < 0.05$), 予以有效片段进行 RNAi 后, 与 CLP 组和阴性对照组相比, phospho-ERK 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$), 见表 1.

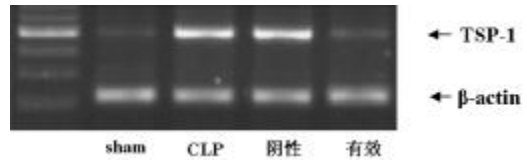


图 1 对照及有效片段组 TSP-1mRNA 表达
Fig. 1 The expression of TSP-1mRNA in control and RNAi group

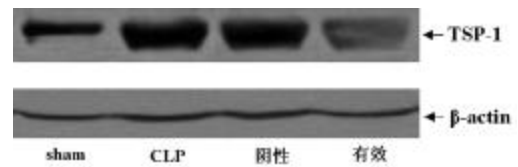


图 2 对照及有效片段组 TSP-1 蛋白印迹结果
Fig. 2 The Western blot results of TSP-1 in control and RNAi group

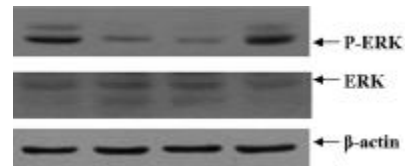


图 3 对照及 RNAi 组 phospho-ERK/ ERK 蛋白印迹结果
Fig. 3 The Western blot results of phospho-ERK/ ERK in control and RNAi group

表 1 RNAi 下调 TSP-1 对脓毒症时肝功能、血清 TNF- α 、ERK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The effect of downregulating TSP-1 by RNAi on the liver function, serum TNF- α and ERK protein expression in mice with septic liver injury ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清 ALT (U/L)	血清 AST (U/L)	血清 TNF- α (pg/mL)	ERK/ β -actin	phospho-ERK/ ERK
sham组	5	30 \pm 2.24	72 \pm 2.12	121.1 \pm 3.51	1.108 \pm 0.125	1.368 \pm 0.134
CLP组	5	140 \pm 4.53	302 \pm 3.54	514.5 \pm 6.83	1.032 \pm 0.113	0.534 \pm 0.094
阴性对照组	5	80 \pm 2.55	392 \pm 4.53	415.9 \pm 5.81	1.024 \pm 0.108	0.516 \pm 0.089
有效片段组	5	30 \pm 1.41*	78 \pm 2.55*	112.7 \pm 3.54*	0.994 \pm 0.129	1.376 \pm 0.126*

与 CLP 组和阴性对照组比较, * $P < 0.05$.

3 讨论

3.1 验证 siRNA-TSP1 片段有效下调肝脏 TSP-1 表达

RNAi 是评价基因功能的新工具, 这一现象在秀丽隐杆线虫中首次描述并命名, 从植物、蠕虫、酵母到人类均可发生^[6]. 外源性或内源性的长双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 被 Dicer 这种内源性 RNA 酶 III 识别并加工成 21-23 个核苷酸的 siRNA, 后者是 RNAi 的效应分子, 通过 siRNA 的反义链识别具有同源序列的靶 mRNA 并使其降解, 导致特定基因沉默^[7]. siRNA 是基因治疗的新形式, 能下调目的基因表达, 使功能蛋白表达降低, RNAi 最显著的特征就是高度序列特异性. 尽管对如何选择最佳 siRNA 认识依然有限, 但 RNAi 高度特异的基因沉默效应已经在许多癌症、神经系统疾病的靶标中得到证实^[8]. 科研中常用的是合成的 siRNA, 这是针对目的基因的靶 mRNA 序列, 使用计算机辅助预测 siRNA 结构设计合成的, 然而这种预测与实际沉默效果的关联性并不确定, 因为它并没有考虑到 RNA 的三级结构以及 RNA 与蛋白质间的相互作用等. siRNA 与靶 mRNA 互补是基因沉默的基础, 干预效应的强弱取决于与靶基因相配的程度. 目前 siRNA 的设计原则很多, 按不同原则设计的 siRNA 序列有差别, 其沉默效应也不同. RNAi 既往成功用于研究肝脏诸多损伤和疾病, 比如炎症、病毒感染、癌症、I/R 损伤等, 据此可望用于探讨脓毒症肝损伤. RNAi 在哺乳动物使用的瓶颈是如何将 siRNA 有效输送到靶细胞、组织、器官. 使用“高压的”或“流体的”注射技术输入裸的、未修饰的 siRNA 片段可引起哺乳动物靶基因表达下调^[9]. 在啮齿动物中流体快速注射 siRNA 是最好的导入方法, 最主要的受体是肝脏, 40% 的肝细胞可以成功获得转基因输入并表达^[9], HTV 注射简单易行又高效, 成为肝脏 RNAi 的优先选择. siRNA 抑制效率与其浓度及作用位点有关, Lewis 等^[10]通过滴定法发现诱导肝脏 RNAi 的 siRNA 用量呈剂量依赖. 对于 RNAi 的基因沉默效果有多种检测方法, 定量 PCR 是在 mRNA 水平验证的首选工具, 分析蛋白表达可以补充和进一步验证. 本实验据此选择 40 μg siRNA 进行 RNAi, 采用 RT-PCR 检测靶基因的沉默, 同时 Western Blot 印迹法分析蛋白变化, 发现能成功下调肝脏 TSP-1 表达, 验证 siRNA-TSP1 片段有效.

3.2 TSP-1 介导脓毒症肝损伤, ERK 通路的抑制

是其分子机制之一

感染时细菌致病成分诱导单核 / 巨噬细胞、淋巴细胞及中性粒细胞过度生成 TNF- α 、IFN- γ 、ILs 和 NO 等炎症介质, 是引发脓毒症的关键因素. TNF- α 是比较明确与 MODS 有关的细胞因子, 作为重要的炎症介质在脓毒症肝损伤时活性明显增高^[10]. 用 TNF- α 特异性 siRNA 腹腔注射脓毒症小鼠, 能提高致命性脂多糖攻击后的存活率 6 倍^[11]. TSP-1 是血小板 α 颗粒的主要成分, 不过并非血小板特有, 而是广泛分布于多种组织, 包括肝脏, 它结构复杂, 含有功能各异的结构域, 作为不同配体与相应受体结合能激活多种信号途径从而发挥多种功能, 正常条件下基础 TSP-1 可忽略不计, 增高的 TSP-1 涉及多系统、多疾病、多病理状态^[12], 如中枢神经系统损伤、肾 I/R 损伤、心梗、高血压、类风湿性关节炎、癌症等, 在创伤、炎症中的作用逐渐引起关注. 据报道^[13] TSP-1 在肾脏 I/R 损伤中表达增高是有害的, 在 TSP-1 敲除小鼠中显示出对 I/R 损伤时肾小管损害和肾功能衰竭的保护作用. 本实验通过 RNAi 下调脓毒症肝脏 TSP-1 表达, 检测到血清转氨酶及 TNF- α 含量下降, 提示 TSP-1 在脓毒症肝损伤中起促炎作用, 与 TNF- α 协同造成肝损伤.

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 是一组分布于胞浆中具有丝 / 苏氨酸双重磷酸化能力的蛋白激酶, 是介导细胞外信号引起细胞核反应的重要信号转导系统, 普遍存在于多种细胞内, 有 ERK、JNK、p38、BMK1 4 个主要成员, 其中 ERK 主要介导细胞内增生、转化及分化的信号传递, JNK 通路在细胞凋亡中起重要而复杂的作用, 而 p38 与炎症反应的关系最为密切^[13], 不同的 MAPK 分子结构相似, 却中介不同的生物反应. MAPK 通路采用磷酸化高度保守的三级激酶级联传递信号, 不同的 MAPK 被不同的上游激酶所激活, 又作用于不同的下游底物, 引起特定的细胞生理反应. ERK 是 MAPK 家族中第一个被确定的激酶, 内毒素所致炎症反应实验显示 ERK 途径虽然并非介导 TNF- α 等炎症介质生成的唯一必需因素, 但它至少在一定程度上调节了 LPS 介导 TNF- α 等炎症介质产生, 在脓毒症中起重要作用^[14]. 严重烧伤后金葡菌感染所致脓毒症可广泛激活体内重要器官 ERK 途径, 参与脓毒症早期全身炎症反应的信号转导, 并与 TNF- α 等细胞因子的合成及释放密切相关^[15]. 不过, 高度保守的 MAPK 是细胞信息传递的交汇点和共同通路, 形成复杂交错的网络, 不同病理生理过程中某一通路的

激活或抑制变化多端,即便均为脓毒症同一通路也可能表现出相反效应,使得对信号转导途径的干预尤为复杂.本实验予以 RNAi 下调肝脏 TSP-1 表达,减缓了脓毒症肝损伤,同时检测到肝脏磷酸化 ERK 通路活化,提示 ERK 通路的抑制可能是 TSP-1 介导脓毒症肝损伤的分子机制之一.

[参考文献]

- [1] WANG P, CHAUDRY I H. Mechanism of hepatocellular dysfunction during hyperdynamic sepsis[J]. *Am J Physiol*, 1996, 270(6):927-933.
- [2] THAKAR C V, ZAHEDI K, REVELO M P, et al. Identification of thrombospondin 1 (TSP-1) as a novel mediator of cell injury in kidney ischemia[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(12):3451-3459.
- [3] PARRISH S, MELLO C, FIRE A, et al. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirements for the two trigger strands in RNA interference [J]. *Molec Cell*, 2000, 6:1077-1087.
- [4] LEWIS D L, HAGSTROM J E, LOOMIS A G, et al. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice[J]. *Nat Genet*, 2002, 32(1):107-108.
- [5] CHAUDRY I H, WICHTERMAN K A, BAUE A E. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels[J]. *Surgery*, 1979, 85(2):205-211.
- [6] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669):806-811.
- [7] BERNSTEIN E, CAUDY A A, HAMMOND S M, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. *Nature*, 2001, 409(6818):363-366.
- [8] MILLER V, XIA H, MARRS G, et al. Allele-specific silencing of dominant disease genes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(12):7195-7200.
- [9] LEWIS D L, WOLFF J A. Delivery of siRNA and siRNA expression constructs to adult mammals by hydrodynamic intravascular injection [J]. *Methods Enzymol*, 2005, 392:336-350.
- [10] KATAGIRI H, ITO Y, ITO S, et al. TNF-alpha induces thromboxane receptor signaling-dependent microcirculatory dysfunction in mouse liver[J]. *Shock*, 2008, 30(4):463-467.
- [11] SORENSEN D R, LEIRDAL M, SIOUD M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice [J]. *J Mol Biol*, 2003, 327(4):761-766.
- [12] ESEMUEDE N, LEE T, PIERRE-PAUL D, et al. The role of thrombospondin-1 in human disease [J]. *J Surg Res*, 2004, 122(1):135-142.
- [13] JOHNSON G L, LAPADAT R. Mitogen-activated protein kinases pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. *Science*, 2002, 298(5600):1911-1912.
- [14] GUHA M, O'CONNELL M A, PAWLINSKI R, et al. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing ELK-1 phosphorylation and Egr-1 expression [J]. *Blood*, 2001, 98:1429-1439.
- [15] 姚咏明, 程明华, 姚胜, 等. 细胞外信号调节激酶抑制剂对烫伤脓毒症大鼠肿瘤坏死因子- α 表达的影响及意义[J]. *中华外科杂志*, 2004, 42(7):391-395.

(2012-02-14 收稿)

更正

《昆明医学院学报》2012年第4期第33卷第78页文章题目更正为:高血流量性阴茎异常勃起10例临床分析.通讯作者更正为:[通讯作者]沈明. E-mail:shenming7@tom.com;覃云凌. E-mail:1181479365@qq.com

昆明医学院学报编辑部

2012年5月10日