文章编号:1000-5404(2008)09-0817-03

论著

Rho 激酶在大鼠严重烧伤后肠黏膜通透性改变中的作用及机制研究

刘依凌,王凤君,陈传莉,王 裴 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 观察严重烧伤早期不同时相点大鼠肠黏膜通透性的变化,探讨 Rho 激酶在这一过程中的作用及机制。方法 常规制备烧伤大鼠模型后取回肠末段,分为正常对照组、烧伤组和烧伤 6 h + Y27632 组,以荧光素标记法(FITC-D)检测大鼠肠黏膜在未烧伤、1、2、6、12、24 h 等不同时相点通透性的变化指标;用 Western blot 法检测肠黏膜肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)、磷酸化 MLC (p-MLC)和 Rho 激酶蛋白水平的变化。结果 严重烧伤后大鼠肠黏膜通透性明显增加,并呈时相依赖性变化,6 ~ 12 h 达到最高;p-MLC 以及 Rho 激酶蛋白表达均明显增加。上述蛋白表达的增强可在加入 Rho 激酶特异性抑制剂 Y27632 后消失。结论 严重烧伤后肠黏膜 Rho 激酶激活和 p-MLC 表达增加,是导致其通透性增加及屏障功能损害的分子机制之一。

关键词:严重烧伤;肠黏膜通透性;Rho 激酶;肌球蛋白轻链磷酸化
中图法分类号:R333.3;R345.57;R644.02 文献标识码:A

Increased intestinal permeability in severely burnt rats: regulatory mechanism of Rho kinase

LIU Yi-ling, WANG Feng-jun, CHEN Chuan-li, WANG Pei (State Key Laboratory Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the changes of intestinal permeability of severely burnt rat and investigate the role of Rho kinase in this process. Methods Fifty-six SD rats were included. Eight rats served as normal control. Burnt rat model was established in the other 48 rats, among which 8 rats were i. p. injected with Rho kinase inhibitor Y27632. The changes of intestinal permeability and the mucosa protein ROCK Ⅱ, myosin light chain (MLC), holistic expression in 40 burnt rats were examined in the end-piece ileum at 1, 2, 6, 12 and 24 h after burn, and in those of 8 rats in intervention group as well as in normal control. Results The intestinal permeability increased significantly in the severely burnt rats, and reached the highest in 6 – 12 h after burn. Phosphorylated MLC and ROCK Ⅱ increased obviously after severe burn, but Rho kinase inhibitor Y27632 counteracted this effect. Conclusion Rho kinase-mediated phosphorylation of MLC pathway is one of molecular mechanisms of increased intestinal permeability and impaired barrier function after severe burn.

Key words: severe burn; permeability; Rho kinase; myosin light chain phosphorylation

肠道是外科应激反应的中心器官[1]。在严重烧伤、创伤及休克等病理状态下,肠道黏膜通透性增加与屏障功能降低以及由此而引起的严重病理生理改变已被广泛认知。但烧伤后肠黏膜通透性增加的分子机制至今仍未完全明了。众所周知,维持肠黏膜上皮屏障完整性的结构基础是肠黏膜上皮细胞间的紧密连接(tight junction)及其相关蛋白功能正常[2-4]。Rho A-ROCK 信号转导通路是细胞外信号导致细胞骨架重组的分子开关,参与内皮屏障功能调节[5,6];Rho 激酶为 Rho A 的靶蛋白。Rho A 的下游效应器 ROCK 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,包括 2 种同源性较高的异构体 ROCKα(ROCK Ⅱ)和 p160ROCK(ROCKβ 或 ROCK Ⅰ)。

本实验通过严重烧伤大鼠模型,研究早期肠黏膜变化规律,以探讨 Rho 激酶在烧伤后肠黏膜通透性增加过程中的作用及分子机制。

作者简介:刘依凌,男,湖南省常德市人,硕士研究生,助教,主要从事烧伤后肠道通透性方面的研究。电话:13527459976, E-mail:lylcom@sohu.com
通信作者:王凤君,电话:(023)68775417
收稿日期:2007-07-24;修回日期:2007-11-28

1 材料与方法

1.1 实验材料

成年SD大鼠56只,体质量200～250 g(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心)。主要试剂:ROCK Ⅱ抗体(美国Upstate公司),肌球蛋白轻链(myosin light chain,MLC)单克隆抗体(美国Sigma公司),p-MLC单克隆抗体(美国Cell signal technology公司),β-actin单克隆抗体(美国Sigma公司),HRP偶联的二抗(美国Southernbiotech公司),Y-27632(美国Boisource公司),超敏ECL化学发光试剂盒(美国Pierce公司),RCDC蛋白测定试剂盒(美国Bio-Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 烧伤模型制备及实验方案 室温(25±2)℃条件下大鼠雌雄分笼,普通饲料喂养1周。实验前12 h禁食,自由饮水。用戊巴比妥钠(25 mg/kg)腹腔麻醉后,除正常对照外,背部电推剃毛,8%硫化钠脱毛后,涂3%凝固汽油燃烧20 s,造成30% TBSAⅢ度烧伤,伤后不补液,分笼喂养,自由进食。将大鼠分为正常对照组、烧伤组、烧伤6 h + Y27632组(Rho激酶特异性抑制剂Y27632,将Y27632用PBS稀释,按2 mg/kg腹腔注入),烧伤组再下设伤后1、2、6、12、24 h 5个时相点,每组8只动物。各组取干净回肠末段2 cm迅速在液氮中冻存。

1.2.2 肠黏膜通透性检测 取烧伤后1、2、6、12、24 h为观察点,用荧光素标记法(FITC-D)检测肠黏膜通透性在各时相点的变化。将FITC-D用磷酸盐溶液配置成20 mg/ml,活杀前麻醉动物并开腹,取距回盲瓣5 cm的末段回肠10 cm,两端结扎,将FITC-D注入该肠段,30 min后取门静脉血1～2 ml,2 000 r/min离心10 min,取100 ml血浆,加入0.9 mol/L PBS混匀,荧光分光光度计检测荧光强度(波长为激发光480 nm,发射光520 nm)。根据标准曲线计算门静脉血FITC-D浓度。

1.2.3 肠MLC、p-MLC以及ROCK激酶表达水平检测 取末端干净回肠2 cm,用载薄片刮取肠黏膜。将刮取肠黏膜溶解在1×buffer细胞裂解液中(在使用前数分钟内加入PMSF,使PMSF的最终浓度为1 mmol/L。按照每20毫克组织加入100～200 μl裂解液的比例加入裂解液)。用玻璃匀浆器匀浆,超声,直至充分裂解。充分裂解后,12 000 r/min离心5 min,取上清,煮沸变性。上样前采用Bradford法测定蛋白浓度。SDS-PAGE电泳分离蛋白、半干电转移(Bio-Rad PowerPac 200)至PVDF膜上。以5%无脂乳封闭背景,分别加入一抗,4 ℃孵育过夜,TBST洗膜后以相应二抗室温孵育1 h。用强化化学发光剂发光显色,以Storm生化检测仪(Molecular Dynamics,美国)直接检测发光信号并将图像输入计算机。

1.2.4 蛋白灰度分析 以β-actin为内参照,结果用Chemi-Doc XRS凝胶分析系统对各条带灰度值比较分析。

1.3 统计学处理

实验数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用Origin统计软件,两组间差异比较行组间t检验,多组间比较行单因素方差分析,以Quantity One软件进行定量分析。

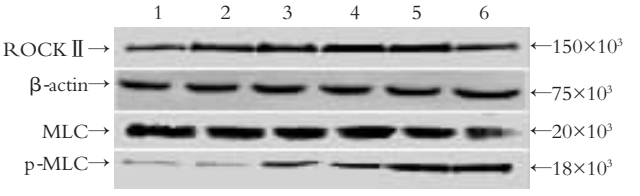
2 结果

2.1 严重烧伤后各时相大鼠肠黏膜通透性的变化

我们建立了烧伤大鼠模型,取末段回肠用FITC-D方法记录了肠黏膜通透性在各时相的变化情况,观察到与正常对照组[(17.29±9.38)mg/ml]相比较,严重烧伤后1、2、6、12、24 h大鼠肠黏膜通透性明显升高,且升高趋势呈时相依赖性变化,6～12 h达到最高($P<0.05$)。而与单纯烧伤后6 h组[(58.03±27.91)mg/ml]比较,加入Rho激酶特异性抑制剂Y27632后大鼠肠黏膜通透性下降[(21.23±11.19)mg/ml,$P<0.05$]。

2.2 严重烧伤后肠道蛋白ROCK Ⅱ、MLC、p-MLC表达水平的变化

与正常对照组比较,严重烧伤后各组ROCK Ⅱ蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),MLC蛋白表达量变化不明显($P>0.05$),但p-MLC蛋白表达量随时间延长逐渐增加,在烧伤后6 h达高峰(图1)。

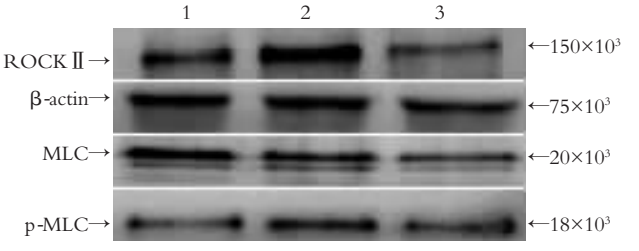


1:正常对照组;2～6:严重烧伤后1、2、6、12、24 h

图1 Western blot检测大鼠严重烧伤后肠黏膜各蛋白表达量的变化

2.3 烧伤大鼠Rho激酶表达变化影响肠黏膜通透性

为了进一步探讨严重烧伤大鼠肠黏膜通透性改变的分子机制,我们在烧伤6 h组加入Rho激酶特异性抑制剂Y27632,同样检测ROCK Ⅱ、MLC、p-MLC的表达水平。与单纯烧伤6 h处理组比较,烧伤6 h + Y27632组ROCK Ⅱ表达减少,同时p-MLC蛋白表达量明显降低($P<0.05$,图2)。



1:正常对照组;2:单纯烧伤6 h组;3:烧伤6 h + Y27632组

图2 Western blot检测加入抑制剂Y27632后肠黏膜各蛋白表达量的变化

3 讨论

血管内皮的损伤是严重烧伤早期重要的病理变化之一,在烧伤早期损害中起核心和关键作用。血管通透性的改变是严重烧伤早期血管内皮损害的主要表现之一,也是严重烧伤早期组织水肿、体液外渗的重要病理基础。但是,严重烧伤早期肠黏膜通透性变化的机制至今尚不明确。新近的研究资料表明[7-10],细胞回缩是各种原因引起肠黏膜屏障通透性增加的共同通路,依赖于MLC的磷酸化。而肌球蛋白轻链磷酸酶(myosin light chain phosphatase,MLCP)是催化MLC从磷酸化型向非磷酸化型转变的重要物质,其活性受

Rho 激酶的负性调控[11,12]。Rho A 的下游效应器 ROCK 是一种丝氨酸/ 苏氨酸蛋白激酶，包括两种同源性较高的异构体 ROCKα（ROCK Ⅱ）和 p160ROCK（ROCKβ 或 ROCK Ⅰ），分子结构包括 N 末端的催化激酶结构域、中部的与 Rho-GTP 结合的卷曲螺旋结构域和 C 末端的激酶底物同源结构域。Rho 激酶接受 Rho 传递的活化信号，多个氨基酸位点被磷酸化而激活，介导下游一系列磷酸化/脱磷酸化反应。活化的 Rho 激酶对 MLCP 中肌球蛋白结合亚单位的第 697 位苏氨酸残基进行磷酸化修饰，并使 MLCP 失活，失活的 MLCP 不能将 p-MLC 去磷酸化，从而使得细胞质内 p-MLC 水平升高。因此我们选择 ROCK Ⅱ作为实验的切入点。

为此，本研究观察了严重烧伤早期不同时相大鼠肠道通透性的变化以及 p-MLC、Rho 激酶蛋白水平的变化和机制。在本研究中，我们首先观察到大鼠肠黏膜的通透性在烧伤早期明显增加，并且呈现时相依赖性变化，其中烧伤 6 ~ 12 h 到达高峰，这与 Carter 等[13] 对大鼠进行烫伤研究的结果和赵云等[14] 对大鼠烧伤后肠黏膜上皮细胞凋亡的研究结果基本一致。因此，我们认为严重烧伤后 12 h 内是防治毒素进入体内的关键期。

通过 Western blot 检测，我们观察到严重烧伤后各组p-MLC蛋白水平明显增加，同时，Rho 蛋白的表达也显著升高。已经明确，p-MLC 蛋白水平的升高即为血管通透性增高的分子基础，其中许多蛋白激酶通路参与了 MLC 磷酸化的信号传递途径，其中包括 PKC、Ca^{2+}-PKG 通路、酪氨酸激酶通路、MAPK 通路等。通过这些不同的信号通路，众多的体液因子可诱导 p-MLC 蛋白水平升高，引起通透性增加。

为了明确 p-MLC 在烧伤早期肠道黏膜通透性变化中的地位和机制，我们在 6 h 组加入了 Rho 激酶特异性抑制剂 Y27632，发现 p-MLC 蛋白水平降低的同时，黏膜通透性也有一定改善，说明 Y27632 对于 Rho 激酶活性的抑制作用影响了 p-MLC 蛋白的表达，进一步影响了肠道黏膜通透性的变化。由此可见，Rho 激酶作为 p-MLC 的上游信号分子参与了烧伤后肠道黏膜通透性的调控。

Rho 激酶为小 G 蛋白 Rho 家族 Rho A 的下游效应器，是 Rho 信号转导通路的关键酶[5]。在多种细胞中，Rho 激酶可通过磷酸化肌球蛋白磷酸酶，继而使 MLC 磷酸化，导致肌动-肌球蛋白收缩，细胞骨架重组，结构改变。但是烧伤对黏膜通透性变化的作用是否也通过 Rho 信号转导通路尚鲜见报道。

因此，明确 Rho 激酶活化所介导的 MLC 磷酸化在严重烧伤后肠黏膜通透性增加及屏障功能损害发生机制中的作用分子机制，对进一步针对 Rho 激酶及 MLCP介导的 MLC 磷酸化的新措施及开发新型的 MLC 磷酸化拮抗剂，以防治烧伤及创伤后肠黏膜通透性增加及屏障功能损害具有重要的指导意义，对研究烧伤及创伤后其他屏障通透性如血管内皮屏障、呼吸道上皮屏障等通透性也有积极的借鉴意义。

参考文献：

[1] Wilmore D W, Smith R J, O 'Dwyer S T, *et al*. The gut: a central organ after surgical stress[J]. Surgery, 1988, 104(5): 917 - 923.

[2] Lapierre L A. The molecular structure of the tight junction[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2000, 41(3): 255 - 264.

[3] Anderson J M. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport[J]. News Physiol Sci, 2001, 16: 126 - 130.

[4] Harhaj N S, Antonetti D A. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(7): 1206 - 1237.

[5] Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTp-binding proteins[J]. Physiol Rev, 2001, 81(1): 153 - 208.

[6] Adamson R H, Curry F E, Adamson G, *et al*. Rho and rho kinase modulation of barrier properties: cultured endothelial cells and intact microvessels of rats and mice[J]. J Physiol, 2002, 539(Pt 1): 295 - 308.

[7] Ma T Y, Tran D, Hoa N, *et al*. Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: role of cytoskeletal involvement[J]. Microsc Res Tech, 2000, 51(2): 156 - 168.

[8] Van-Hinsbergh V W, van-Nieuw-Amerongen G P. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function[J]. J Anat, 2002, 200(6): 549 - 560.

[9] Clayburgh D R, Shen L, Turner J R. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease[J]. Lab Invest, 2004, 84(3): 282 - 291.

[10] Birukova A A, Smurova K, Birukov K G, *et al*. Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction[J]. Microvasc Res, 2004, 67(1): 64 - 77.

[11] Essler M, Amano M, Kruse H J, *et al*. Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase *via* Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells[J]. J Biol Chem, 1998, 273(34): 21867 - 21874.

[12] Carbajal J M, Schaeffer R C, Jr. Rho A inactivation enhances endothelial barrier function[J]. Am J Physiol, 1999, 277(5 Pt 1): C955 - C964.

[13] Carter E A, Tompkins R G, Schiffrin E, *et al*. Cutaneous thermal injury alters macromolecular permeability of rat small intestine[J]. Surgery, 1990, 107(3): 335 - 341.

[14] 赵　云，王凤君，王　裴，等. 大鼠烧伤后肠黏膜上皮细胞凋亡及其相关调控因子变化的研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(18)：1631 - 1633.

（编辑　吴培红）