论著

文章编号:1000-5404(2009)10-0952-03

地塞米松和法舒地尔对油酸致小鼠急性肺损伤伤情的影响

陈星云,杨 楠,赵 艳,熊仁平,李 平,刘 苹,钟小龙,周元国 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所分子生物学中心,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨地塞米松和法舒地尔(fasudil)对油酸致小鼠急性肺损伤的影响及ROCK(Rho-associated coiled-coil forming kinase)在其中的作用。**方法** 采用油酸致C57小鼠急性肺损伤模型,观察伤后24 h各组肺组织病理及肺含水率、ROCK活性、ROCK1和ROCK2蛋白含量及IL-1β mRNA的变化。**结果** 地塞米松和法舒地尔均可显著减轻油酸肺组织中炎性细胞浸润、肺出血等病理变化,降低肺含水率($P<0.05$),抑制肺组织ROCK活性($P<0.05$),降低IL-1β mRNA的表达水平;地塞米松对ROCK1的表达水平无影响,但可增强ROCK2的表达,法舒地尔对ROCK1和ROCK2的表达水平均无影响。**结论** 地塞米松和法舒地尔均可通过抑制肺组织内炎性细胞浸润明显减轻油酸引起的急性肺损伤,而地塞米松的治疗作用可能与对其ROCK活性的抑制有关。

关键词: 急性肺损伤;地塞米松;法舒地尔;ROCK1;ROCK2

中图法分类号: R563.05;R969;R977.1 **文献标识码:** A

Both dexamethasone and fasudil attenuate oleic acid-induced acute lung injury in mice

CHEN Xing-yun, YANG Nan, ZHAO Yan, XIONG Ren-ping, LI Ping, LIU Ping, ZHONG Xiao-long, ZHOU Yuan-guo (Center of Molecular Biology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of dexamethasone and fasudil on oleic acid-induced acute lung injury in mice and the roles of Rho-associated coiled-coil forming kinase (ROCK) in this process. **Methods** Totally 140 SPF grade C57 mice were randomly and equally divided into 4 groups: normal control, acute lung injury group, dexamethasone group and fasudil group. The animals of the later 3 groups were inflicted by an injection of 0.6 mg/g oleic acid through tail vein to induce acute lung injury model, and then followed by injecting normal saline at same volume, 5 mg/kg dexamethasone and 10 mg/kg fasudil respectively. The normal control group only received normal saline injection. All mice were sacrificed 24 h after injury and the lungs were resected. The pulmonary pathology was examined by HE staining, the activities of ROCK1 and ROCK2 were assayed by ELISA, the expression levels of ROCK1 and ROCK1 protein were detected by Western blot analysis, and the expression level of IL-β mRNA were observed by real-time PCR. **Results** After treatment with dexamethasone or fasudil, the bleeding and infiltration in lung tissue induced by oleic acid were attenuated, the lung water content was decreased significantly, the activities of ROCK1 and ROCK2 were inhibited, and the expression level of IL-1β mRNA was declined. Dexamethasone had no effect on the expression level of ROCK1 but upregulated the expression of ROCK2 significantly. Both of the expression level of ROCK1 and ROCK2 had no significant changes after treatment with fasudil. **Conclusion** Both of dexamethasone and fasudil attenuate the lung injury induced by oleic acid through inhibiting the activity of ROCK. The different effects of dexamethasone and fasudil on the expression levels of ROCK1 and ROCK2 suggest that effects of ROCK1 and ROCK2 in the treatment of dexamethasone or fasudil in oleic acid induced lung injury are different.

Key words: acute lung injury, dexamethasone, fasudil, Rho-associated coiled-coil forming kinase 1, Rho-associated coiled-coil forming kinase 2

基金项目: 国家自然科学基金(30470988);教育部创新团队基金(IRT0712)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470988) and the Project for Innovation Team of Ministry of Education (IRT0712)

作者简介: 陈星云,男,河南省封丘市人,博士,助理研究员,主要从事急性肺损伤与糖皮质激素作用机制方面的研究。电话:(023)68757472,E-mail:xingyunchen@gmail.com

通信作者: 周元国 电话:(023)68757471,E-mail:ygzhou@cta.cq.cn

收稿日期: 2009-03-20;**修回日期:** 2009-04-10

急性肺损伤是以肺毛细血管通透性增加和肺水肿为特征的严重呼吸系统疾病。无论在临床或者实验动物模型中,循环中的中性粒细胞在急性肺损伤的发病过程中均具有重要作用[1]。中性粒细胞扣押于肺毛细血管系统并游走入肺实质中是急性肺损伤发病机制中的关键环节,而中性粒细胞受炎性介质诱导定位并黏附于损伤部位毛细血管是中性粒细胞扣押于肺部毛细血管的关键步骤[2]。

糖皮质激素用于多种临床疾病的治疗,其治疗效应与其抑制中性粒细胞浸润和炎性细胞因子释放有关[3]。ROCK(Rho-associated coiled-coil forming kinase)是小 G 蛋白 RhoA 的主要效应分子,有 ROCK1 和 ROCK2 2 种亚型[4]。研究表明 ROCK 抑制剂可显著减轻内毒素导致的急性肺损伤[5],ROCK1 在介导中性粒细胞向损伤组织浸润、炎性因子释放过程中发挥重要作用[6]。糖皮质激素可抑制 ROCK1 活性,因此糖皮质激素抑制中性粒细胞浸润和炎性因子释放的作用可能与其对 ROCK 活性的抑制有关。本研究采用油酸急性肺损伤模型比较糖皮质激素和 ROCK 抑制剂法舒地尔对急性肺损伤治疗效应的差异,探讨 ROCK 在糖皮质激素治疗急性肺损伤中的作用。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

油酸(成都市科龙化工试剂厂),法舒地尔(天津红日药业股份有限公司),ROCK1 和 ROCK2 抗体(BD, 美国),地塞米松(Sigma,美国), Tripure(罗氏公司,瑞士),ROCK 活性检测试剂盒(Cyclex, Cy-1160, 日本)。

1.2　实验动物分组

SPF 级 c57 小鼠 140 只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),雌雄不拘,体质量 18 ~ 22 g,分为 4 组:对照组、油酸组、地塞米松组和法舒地尔组,每组 35 只,(8 只分别用于肺含水率测定、ROCK 活性检测、ROCK1 和 ROCK2 蛋白免疫印迹分析和 IL-1β mRNA 定量 PCR 分析,3 只用于肺组织病理观察)。油酸组从尾静脉注入 0.6 mg/g 的油酸,对照组组注入同等体积生理盐水,致伤时,地塞米松组和法舒地尔组分别在注入油酸 30 min 后尾静脉给与 5 mg/kg 地塞米松和 10 mg/kg 的法舒地尔。致伤后 24 h 活杀,同时取肺组织进行病理切片和肺含水率测定和 ROCK1、ROCK2 Western blot 分析。

1.3　肺含水率测定

动物活杀取全肺称湿质量后置于 70 ℃ 烤箱中烘烤 72 h 至恒重,称干质量后计算肺含水率。

肺含水率 =(肺湿质量 - 肺干质量)/肺湿质量 × 100%

1.4　ROCK 活性的 ELISA 检测

匀浆缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.1% Triton X-100,1 mmol/L EDTA,1 mmol/L EGTA,0.5 mmol/L PMSF, 1 μl/ml pepstatin, 0.5 μg/ml leupeptin, 10 mmol/L NaF, 2 mmol/L Na_3VO_4, 10 mmol/L beta-mercaptoethanol)中电动匀浆器匀浆肺组织 10 000 × g, 4 ℃离心 15 min,取上清按试剂盒说明测定肺组织 ROCK 活性。

1.5　ROCK1 和 ROCK2 蛋白含量的 Western blot 分析

常规方法提取肺组织总蛋白,考马斯亮蓝法测定蛋白含量后按照本实常规方法进行 Western blot 分析。

1.6　IL-1β mRNA 的荧光实时定量 RT-PCR 检测

Tripure 法提取总 RNA,紫外定量后采用逆转录试剂盒(TaKaRa)200 ng 总 RNA 进行逆转录,后用实时荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa)定量检测, 定量 PCR 引物序列:IL-1β 上游 5′-GTGTGACGTTCCCATTAGAC-3′, 下游 5′-CATTGAGGTGGAGAGCTTTC-3′,产物长度 104 bp;GAPDH 上游 5′-AGGTTGTCTCCTGCGACTTCA-3′,下游 5′-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3′,产物长度 184 bp,PCR 反应条件:95 ℃ 5 min,95 ℃ 30 s, 61 ℃ 15 s, 72 ℃ 15 s, 共 40 个循环。

以 IL-1β 占同一样品 GAPDH 的比例为 IL-1β 的相对表达水平,以各组与对照组 IL-1β 的相对表达水平的比率作为IL-1β 的最终相对表达水平进行统计分析。

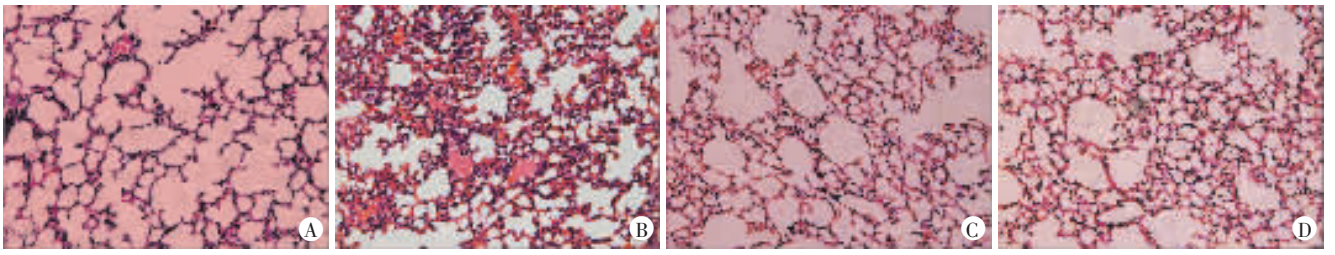
1.7　统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Sigmastat 3.0 统计软件行 t 检验。

2　结果

2.1　肺组织病理变化

油酸致伤后 24 h,肺组织病理切片可见肺组织内有大量出血灶、肺泡塌陷,肺组织水肿实变,大量炎性细胞浸润。地塞米松和法舒地尔处理后肺组织内出血灶明显减少,肺泡塌陷及肺组织水肿减轻,炎性细胞浸润减少(图 1)。



A:对照组;B:油酸组;C: 法舒地尔组; D:地塞米松组

图 1　光镜下观察各组肺组织病理学变化　(HE × 200)

2.2 肺含水率的变化

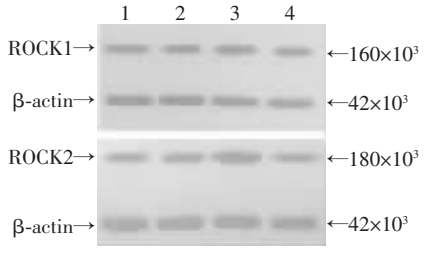
油酸致急性肺损伤后 24 h,肺含水率显著升高[对照组(76.60 ± 0.16)%, 油酸组(81.40 ± 0.34)%,$P < 0.05$],地塞米松(77.60 ± 0.26)% 和法舒地尔(77.00 ± 0.41)% 处理可显著降低油酸致伤引起的肺含水率升高($P < 0.05$),地塞米松组和法舒地尔组肺含水率与正常组相比无显著差异($P > 0.05$)。

2.3 肺组织 ROCK 活性的变化

油酸致急性肺损伤后 24 h,肺组织 ROCK 活性显著升高[对照组(0.372 ± 0.025),油酸组(0.712 ± 0.038), $P < 0.05$],地塞米松(0.407 ± 0.030)和法舒地尔(0.403 ± 0.030)处理可显著降低油酸致伤引起的肺组织 ROCK 活性升高($P < 0.05$),地塞米松组和法舒地尔组肺组织 ROCK 活性与正常组相比无统计学差异($P > 0.05$)。

2.4 ROCK1 和 ROCK2 蛋白表达的变化

油酸致急性肺损伤后 24 h,肺组织 ROCK1 和 ROCK2 表达均无显著变化($P > 0.05$),地塞米松和法舒地尔处理对 ROCK1 的表达也无显著影响 ($P > 0.05$),但地塞米松组 ROCK2 表达水平与对照组和法舒地尔组相比显著升高($P < 0.05$),法舒地尔组肺组织 ROCK2 表达水平与正常组相比无显著差异($P > 0.05$)(图 2)。



1:对照组;2:油酸组;3:地塞米松组;4:法舒地尔组

图 2 各组肺组织中 ROCK1 和 ROCK2 蛋白表达的变化

2.5 IL-1β mRNA 表达的变化

油酸致伤后,肺组织 IL-1β mRNA 表达显著上调[对照组(1.00 ± 0.17),油酸组(5.31 ± 1.73),$P < 0.05$],地塞米松组(1.87 ± 0.66)和法舒地尔组(1.38 ± 0.30)肺组织 IL-1β mRNA 表达水平与油酸组相比明显降低($P < 0.05$),但仍高于对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究表明,油酸致伤后肺含水率、肺组织内炎性细胞浸润明显增多,ROCK 活性显著升高,而地塞米松和法舒地尔均可使肺含水率降低,同时明显抑制肺组织内的炎性细胞浸润,降低肺组织 ROCK 活性,由于炎性细胞浸润是急性肺损伤中发病的关键环节,ROCK1 是介导炎性细胞募集、浸润的关键分子[4],提示地塞米松可能是通过抑制 ROCK 活性抑制炎性细胞浸润发挥治疗急性肺损伤的效应的。

本研究对肺组织内 ROCK1 和 ROCK2 蛋白含量的检测表明,油酸致伤及法舒地尔处理对小鼠肺组织内 ROCK1 和 ROCK2 的蛋白含量均无明显影响,而地塞米松处理则可使 ROCK2 蛋白表达水平升高,对 ROCK1 表达水平无明显影响,这一结果与文献[7]报道一致,提示地塞米松可能主要通过抑制 ROCK1 活性抑制炎性细胞向损伤部位浸润发挥保护作用。

油酸与内皮细胞结合后通过脂质过氧化导致内皮细胞形态改变而导致血管通透性增加[8,9],这可能是由于 Rho/ROCK 信号通路活化引起的[10];此外,内皮活化和功能障碍也参与了 ARDS 的肺水肿的发病机制,因此地塞米松和法舒地尔可能通过抑制 ROCK 活性抑制血管通透性的增加,减轻肺水肿程度。

由于炎性细胞因子释放是造成急性肺损伤的重要原因,肺组织 IL-βmRNA 的变化表明,糖皮质激素和法舒地尔可通过抑制 ROCK 活性抑制炎性细胞向损伤部位的募集而降低损伤部位炎性因子的表达水平。

总之,本研究表明,糖皮质激素和法舒地尔均可减轻油酸诱导的急性肺损伤,该作用可能是通过抑制 ROCK 介导的炎性细胞浸润和内皮细胞功能障碍,降低损伤部位炎性因子表达水平实现的。

参考文献:

[1] Hidalgo A, Chang J, Jang J E, *et al*. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury[J]. Nat Med, 2009, 15(4): 384 – 391.

[2] Zemans R L, Colgan S P, Downey G P. Trans-Epithelial Migration of Neutrophils: Mechanisms and Implications for Acute Lung Injury[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009, 40(5): 519 – 535.

[3] Mesotten D, Vanhorebeek I, Van-den-Berghe G. The altered adrenal axis and treatment with glucocorticoids during critical illness[J]. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008, 4(9): 496 – 505.

[4] Kume H. RhoA/Rho-kinase as a therapeutic target in asthma[J]. Curr Med Chem, 2008, 15(27): 2876 – 2885.

[5] Tasaka S, Koh H, Yamada W, *et al*. Attenuation of endotoxin-induced acute lung injury by the Rho-associated kinase inhibitor, Y-27632[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 32(6): 504 – 510.

[6] Noma K, Rikitake Y, Oyama N, *et al*. ROCK1 mediates leukocyte recruitment and neointima formation following vascular injury[J]. J Clin Invest, 2008, 118(5): 1632 – 1644.

[7] Rubenstein N M, Callahan J A, Lo D H, *et al*. Selective glucocorticoid control of Rho kinase isoforms regulate cell-cell interactions[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354(2): 603 – 607.

[8] Davidson K G, Bertsen A D, Barr H A, *et al*. Lung function, permeability, and surfactant composition in oleic acid-induced acute lung injury in rats[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(6): L1091 – L1102.

[9] 陶 军, 杨天德, 陈祥瑞. 肺上皮屏障在油酸致肺损伤后肺水肿发生中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(3): 212 – 214.

[10] Breslin J W, Yuan S Y. Involvement of RhoA and Rho kinase in neutrophil-stimulated endothelial hyperpermeability[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(3): H1057 – H1062.

(编辑 王小寒)