DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.021

论著

文章编号:1000-5404(2002)10-1176-03

脂多糖诱导急性肺损伤大鼠肺组织GRK2变化的实验研究

肖贞良,孙耕耘,钱桂生,夏前明 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 探讨脂多糖(LPS)诱导急性肺损伤(ALI)大鼠肺组织G蛋白偶联受体激酶2(GRK2)的变化规律。方法 Wistar大鼠18只,随机分为3组。LPS组自尾静脉注射LPS 8 mg/kg,LPS+山莨菪碱组注射LPS8 mg/kg+山莨菪碱10 mg/kg,正常对照组注射等量生理盐水。90 min放血处死后取肺脏,用Western blot检测各组GRK2的变化。结果 LPS组和LPS+山莨菪碱组GRK2表达较正常对照组显著增加,LPS组和LPS+山莨菪碱组GRK2表达无显著差异。结论 Wistar大鼠肺组织有GRK2表达;LPS诱导的ALI大鼠肺组织GRK2表达显著增加,山莨菪碱对LPS诱导的ALI大鼠肺组织GRK2表达增加无显著抑制作用。

关键词:G蛋白偶联受体激酶;脂多糖;急性肺损伤;大鼠
中图法分类号:R392.11;R563.02;R977.7 文献标识码:A

Changes of GRK2 in lung tissue of rats after lipopolysaccharide induced acute lung injury

XIAO Zhen-liang, SUN Geng-yun, QIAN Gui-sheng, XIA Qian-ming (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the change rule of G protein-coupled receptor kinase 2(GRK2) in the lung tissue of rats with acute lung injury(ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS). Methods A total of 18 Wistar rats were randomly divided into 3 groups without caring sex. LPS group receiving 8 mg/kg LPS injection in tail vein, LPS+anisodamine group given 8 mg/kg LPS+10 mg/kg anisodamine injection in the same method as above, and normal control group getting equal volume of normal saline. All rats were killed by cutting off carotid artery 90 min after medication, and their lungs were taken out then. GRK2 in lung tissue of different groups were measured with Western blotting. Results GRK2 expression was significantly increased in LPS group and LPS+anisodamine group than in normal control group. No significant difference on GRK2 expression was found between LPS group and LPS+anisodamine group. Conclusion GRK2 is expressed in the lung tissue of Wistar rats, and significantly up-regulated in lung tissue in LPS induced ALI rats. Anisodamine cannot inhibit the GRK2 over-expression under the condition.

Key words: G protein coupled receptor kinase; lipopolysaccharide; acute lung injury; rats

急性肺损伤(Acute lung injury,ALI)的发病机制很复杂,目前尚未完全阐明。我们既往的研究表明[1,2],β-肾上腺素能受体(β-adrenergic receptor,β-AR)与ALI的发生关系密切;脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)诱导的ALI模型大鼠肺组织β-AR是下调的,下调机制推测与受体表达减少、受体蛋白降解、受体内化等有关。目前认为与β-AR内化密切相关的主要有两类分子:即G蛋白偶联受体激酶(G protein-coupled receptor-kinase,GRKs)和β-arrestins。GRKs分为GRK1-GRK7 7种亚型,与β-AR相关的是GRK2和GRK3,所以GRK2和GRK3又分别称为β-受体激酶1(β-ARK1)和β-受体激酶2(β-ARK2),其中起主要作用的是GRK2[3]。本研究主要探讨LPS诱导ALI大鼠肺组织GRK2的变化及山莨菪碱的干预作用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070334,39730210)。
作者简介:肖贞良(1965-),男,四川省邛崃市人,博士研究生,主治医师,主要从事ARDS基础和临床方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68755320
收稿日期:2002-01-21;修回日期:2002-03-12

1 材料和方法

1.1 试剂和动物

大肠杆菌LPS(Sigma血清型055:B5),山莨菪碱(天津药业焦作分公司),GRK2多抗(兔抗鼠)和地高辛标记的羊抗兔IgG(Santa Cruz)。普通试剂均为国产分析纯。Wistar大鼠购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 仪器

Laboguge 400R低温离心机(Heraeus),垂直电泳槽(北京六一仪器厂),Trans-Blot SD半干电转仪(BIO-RAD),Lambda Bio20紫外分光光度计(Perkin Elmer),SK-100 Image System(上海四新生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 LPS诱导的ALI大鼠模型的复制 采用我所常规方法进行[1]。取Wistar大鼠18只,随机分为3组,每组6只,雌雄不拘。用自制鼠笼固定大鼠,75%乙醇消毒,涂二甲苯扩张尾部血管。LPS组自尾静脉注射LPS 8 mg/kg,LPS+山莨菪碱组注射LPS 8 mg/kg+山莨菪碱10 mg/kg,正常对照组注射等量生理盐水。90 min后腹腔注射速眠新麻醉,切断颈动脉放血处死,取出肺脏置冰上,用滤纸吸去血迹后立即进行蛋白抽提。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3.2　Western blot 检测 GRK2　① 蛋白提取和定量: 各取 100 mg 肺组织, 加 2 ml 冰冷的细胞裂解液(50 mmol/L pH 8.0 Tris·HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.02% 叠氮钠, 100 μg/ml PMSF, 1 μg/ml Aprotinin, 1% Triton X-100), 冰浴, 用电动玻璃匀浆机匀浆。12 000× g, 4 ℃离心 10 min, 取上清用紫外分光光度计进行蛋白定量, 并将蛋白调整至 2 mg/ml。②SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE): 根据目的蛋白分子量大小选择 8%的分离胶和 3%的浓缩胶进行 SDS-PAGE。每个泳道点样 20 μl(蛋白样品和上样缓冲液 1∶2), marker 点样 10 μl。电泳完成后用 R250 考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色, 观察是否有需要的条带。相关试剂配制参照文献[4]进行。结果用 SK-100 Image System 凝胶成像系统扫描存盘。③转膜和封闭: 根据凝胶大小剪取 PVDF 膜, 甲醇浸泡, dH_2O 漂洗, 转移缓冲液平衡 5 min; 用半干电转仪按说明书将蛋白转移至 PVDF 膜, 并在 0.02%的氨基黑中快速染色, 直至分子量标准显现时取出, 记录下标准位置。100 ml 水洗涤 PVDF 膜, 脱色缓冲液漂洗 10 min。将膜封入塑料袋中, 加封闭液(5%脱脂奶粉, 0.05%Tween-20, TBS 溶解)封闭 90 min。④抗原抗体反应: 加封闭液 1∶1 000 稀释的一抗(GRK2 多抗)4 ℃过夜。含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗膜 5 min× 3。室温下与结合有 HRP 的二抗孵育 90 min。二抗用封闭液稀释至 1∶1 000。含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗膜 5 min×3, 再用 TBS 洗膜 5 min。将膜置 DAB 中显色, 直至显出清晰条带。结果用扫 SK-100 Image System 凝胶成像系统扫描存盘, 并比较各条带积分吸光度。

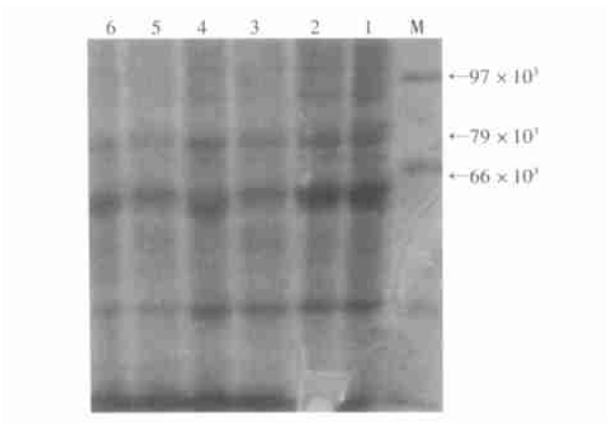
1.4　统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 BS 统计软件处理, 组间和组内差异比较选用 t 检验。

2　结果

2.1　SDS-PAGE 结果

蛋白电泳结果见图 1。GRK2 分子量为 79×10^3, 故 79×10^3 处的蛋白条带为本实验所需条带。



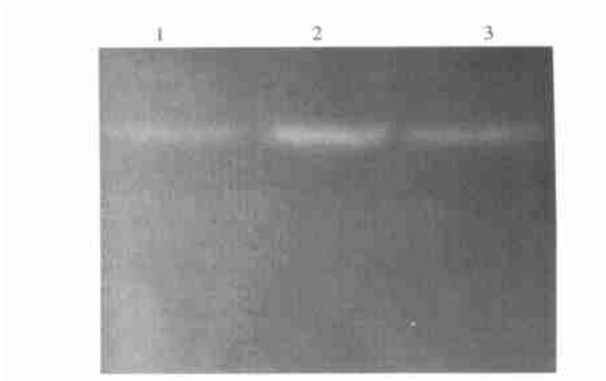
M: marker; 1 and 2: Normal control group; 3 and 4: LPS; 5 and 6: LPS+anisodamine

图 1　大鼠肺组织蛋白 **SDS-PAGE** 结果

Fig 1　SDS-PAGE analyses of the lysates from rat lung tissues

2.2　Western blot 结果

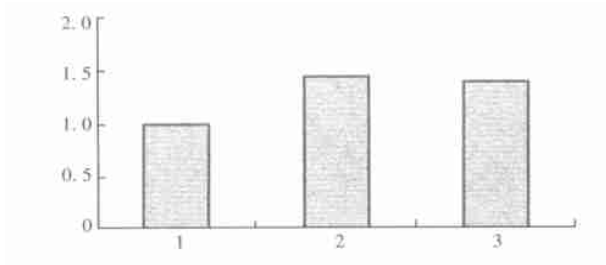
Western blot 检测 GRK2 结果见图 2。设定正常对照组 GRK2 含量为 1, 根据条带密度计算出 LPS 组 GRK2 含量为 1.447±0.302, LPS+山莨菪碱组 GRK2 含量为 1.393±0.155。正常对照组与 LPS 组、正常对照组与 LPS+山莨菪碱组比较, $P<0.01$; LPS 组与 LPS+山莨菪碱组比较, $P>0.05$。各组 GRK2 含量比较见图 3。



1: Normal control; 2: LPS; 3: LPS+anisodamine

图 2　检测 **GRK2** 结果

Fig 2　Western blot of the lysates from rat lung tissues



1: Normal control; 2: LPS; 3: LPS+anisodamine

图 3　各组条带中 **GRK2** 含量比较

Fig 3　Comparison of GRK2 contents among bands in different groups

3　讨论

本实验蛋白电泳结果提示在 79×10^3 处存在一清晰条带, Western blot 结果证实为 GRK2, 表明 Wistar 大鼠肺组织有 GRK2 表达。

β-AR 是一种 G 蛋白偶联受体, 分为 β1-AR、β2-AR 和 β3-AR, 肺组织的主要表达 β2-AR。我们既往发现, 内毒素性 ALI 大鼠肺组织的 β-AR 是下调的, 推测下调的机制可能与受体内化有关。GRK2 是一种与 β-AR 内化关系密切的激酶。本实验结果显示 LPS 组 GRK2 的表达较正常对照组显著增加; GRK2 表达增加可促进 β-AR 与 β-arrestins 的结合, 从而促进 β-AR 的内化。这可能是 ALI 大鼠肺组织 β-AR 下调和 β-AR 激动剂失敏的重要机制。

山莨菪碱是一种 M 胆碱能受体阻滞剂。有实验表明山莨菪碱可抑制 ARDS 动物肺组织 β-AR 下调。本实验中 LPS+山莨菪碱组 GRK2 的表达与 LPS 组相似, 表明山莨菪碱对 LPS 诱导的 GRK2 表达增加无明显的阻断或抑制作用; 山莨菪碱可能通过抑制 LPS 与细胞结合等其它机制抑制肺组织 β-AR 下调。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

综上所述，Wistar 大鼠肺组织有 GRK2 表达；LPS 可诱导 Wistar 大鼠肺组织 GRK2 表达增加；山莨菪碱对 LPS 诱导的 Wistar 大鼠肺组织 GRK2 表达增加无明显抑制作用。

参考文献：

[1] 孙耕耘，毛宝龄，吕宝璋. 大鼠内毒素性肺损伤中 α-1 和 β-受体的变化[J]. 中国病理生理杂志，1993，9(5)：622—626.
[2] 徐兴祥，孙耕耘，钱桂生. 急性肺损伤大鼠肺组织 β 和 β-2 受体 mRNA 表达的变化[J]. 中国病理生理杂志，1999，15(4)：369—371.
[3] Penela P，Alvarez-Dolado M，Munoz A，*et al*. Expression patterns of the regulatory proteins G protein-coupled receptor kinase 2 and β-arrestin1 during rat postnatal brain development[J]. Eur J Biochem，2000，267(14)：4390—4396.
[4] J. 萨姆布鲁克，E. F. 弗里奇，T. 曼尼阿蒂斯著，金冬雁，黎孟枫等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1996.888—897.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)10-1178-01

摇门式手术联合鼻骨骨折术纠正骨部歪鼻 4 例

Corretion of bony wry nose with comined Metzenbaum′s method and nasal osteoplasty in 4 cases

石 磊 （青海医学院附属医院耳鼻咽喉科，西宁 810001）

歪鼻是一种常见的鼻部畸形，分为软骨部和鼻骨部发育畸形两种，多为先天性畸形或外伤性畸形，然而在临床中我们发现歪鼻为软骨部和骨部复合性畸形。并且合并有鼻中隔偏曲，嵴突。因此使用摇门式手术方法纠正该类型歪鼻效果不理想，我科于 1997—2001 年应用摇门式手术联合鼻骨骨折术对 4 例骨部歪鼻进行手术，经临床观察后整形效果满意，报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

4 例为男性，年龄 19～25 岁，病程 10～20 年，无明显外伤史，临床检查：4 例鼻梁均向右歪斜，右鼻背窄，左鼻背较宽，右鼻腔狭窄，左鼻腔变宽。其中 2 例左下鼻甲肥大，鼻中隔嵴突，不同程度鼻塞并伴头痛。

1.2 手术方法

30°仰卧位，双鼻腔 2%地卡因（含 0.1%肾上腺素 3 ml）棉片表面麻醉，2%利多卡因含 0.1%肾上腺素进行双侧筛前神经、眶下神经、蝶腭神经节部阻滞麻醉。4 例均采用左侧鼻中隔切口，具体方法：①在鼻中隔软骨前缘处行弧状切口，切开粘——软骨膜并延伸至鼻底，分别剥离鼻中隔两侧粘——软骨膜，向后达筛骨垂直板、犁骨的粘——骨膜。嵴突部小心剥离以防硬损。②分离鼻中隔软骨使之与骨部脱离直到鼻底部，用软骨刀在鼻骨嵴处切断中隔软骨与鼻骨连接，应注意不切破皮肤。同时分离鼻中隔软骨下缘与上颌骨鼻嵴相连，此时可使鼻中隔软骨呈游离状能左右摆动，咬除筛骨垂直板及犁骨偏曲部，凿除嵴突，并根据情况细条状行切除鼻中隔软骨后缘部分。③经鼻腔浸润麻醉双侧鼻骨前缘部组织，在鼻腔内沿鼻骨缘作 0.5 cm 斜向切口，切至皮下勿破损。用软骨刀伸入切口分离鼻骨与皮下组织，达内眦线下并不超越中线，从此处伸入直血筐钳张口夹持住鼻骨左右扭动使之骨折。④将鼻中隔软骨推回中线位观不弹回原来偏斜位置，并将左侧松弛鼻中隔粘——软骨膜酌情纵形条状切除，缝合切口以使鼻中隔固定于中线位，同时切除肥大下鼻甲。⑤双侧鼻腔填塞等量的碘仿纱条，使鼻中隔保持在中线位。术后使用抗生素预防感染，镇痛对症治疗，并酌情应用糖皮质激素以减轻鼻部肿胀，5 d 后逐渐抽除鼻腔纱条，术后 1 个月内禁止触压外鼻或用力擤鼻。

2 结果

4 例术后抽纱条后整形满意，经 3 个月随访歪鼻纠正，鼻塞、头痛症状消失。

3 讨论

摇门式手术为 Metzenbaum（1929）所创用，后经 Seltzer（1963）及 Safiem、Steffensen、Berson 等不断改进而形成的方法，用于矫正鼻中隔软骨段和软骨部鼻背歪斜即歪鼻的整形治疗[1]。然而我们在临床中发现歪鼻不但有上述畸形，还合并有鼻骨部极度不对称，筛骨、犁骨偏曲及嵴突，仅用摇门式手术整形难以达到满意效果，因此设想在摇门式手术基础上结合一种较为简便的鼻骨整形方法。受鼻骨伤后畸形愈合需通过人为性的将鼻骨骨折进行重新复位的启发，我们对 4 例骨部歪鼻进行了这种形式的手术治疗，手术整形均达到满意效果。以往骨部歪鼻多采用凿骨术[2]，经鼻背板作皮下分离，将犁状孔周围骨质（鼻骨、上颌骨、额突）从骨膜下分离，用骨锯、骨剪或骨凿在较宽的一侧的鼻背，连同鼻腔粘膜切除一块楔状骨片；在较窄一侧分离鼻腔粘膜及鼻侧皮肤，以暴露犁状孔边缘，将上颌骨额突向上凿开至鼻根，用手指压力使鼻梁复位于中线，由于此可见手术难度大，易误伤颅底信及部组织。因此利用摇门式手术联合鼻骨骨折术可以有效地避免上述情况发生。

关键词：摇门式手术；鼻骨骨折术；骨性歪鼻
中图法分类号：R765.7 文献标识码：B

参考文献

[1] 黄选兆，汪吉宝. 实用耳鼻咽喉科学[M]. 北京：人民出版社，1998.1990—200
[2] 武汉医学院第一附属医院耳鼻咽喉科学教学教研. 耳鼻咽喉科学[M]. 北京：人民卫生出版社，1978.14.

（编辑 张 宁）

作者简介：石 磊（1963—），男，青海省西宁市人，主治医师，主要从事耳鼻咽喉科临床教学和临床治疗方面的研究，发表论文 11 篇。电话：(0971)6162520

收稿日期：2002-03-25；修回日期：2002-08-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net