

· 基础研究 ·

## p38 MAPK 在内毒素休克小鼠肺组织诱导型 一氧化氮合酶表达中的作用

阚文宏 闫文生 姜勇 黄巧冰 王静珍 王士雯 赵克森

**【摘要】**目的 观察脂多糖(LPS)诱导的小鼠肺组织诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达的变化趋势,探讨 p38 丝裂原激活的蛋白激酶(p38 MAPK)在内毒素休克发生中的作用。方法 复制小鼠内毒素休克动物模型,分别观察 LPS 作用和组织中 iNOS 表达的时间过程、剂量-效应关系及 p38 MAPK 在其中的作用。动物在 LPS 处理后,收集血液,用 Griess 法检测血浆一氧化氮(NO)水平;取肺、肝、肾等组织样本,分别用 Western 印迹法和 RT-PCR 检测组织 iNOS 蛋白和 mRNA 表达,用免疫沉淀和放射自显影检测组织 p38 MAPK 活性。结果 ① 腹腔注射 LPS 后可引起双峰型进行性的动脉血压下降,6h 后达到重度休克;② iNOS 在正常肺中就有少量表达,注射内毒素后肺组织 iNOS mRNA 和蛋白表达增加,血浆中 NO 水平升高,它们与 LPS 存在剂量-效应关系,并且在一定的时间范围内,随着 LPS 作用时间的增加 iNOS 表达也增高;③ 注射 LPS 后,在心、肝、脾、肺、肾、肠等组织中,肺 iNOS 表达最早,水平最高;④ LPS 注射的小鼠 iNOS 表达增高的同时,肺中 p38 MAPK 信号转导通路被激活;用 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB 203580 后,可以显著降低血浆 NO 水平及肺组织中 iNOS mRNA 和蛋白的表达,但对血压下降并无显著性影响。结论 在正常情况下,小鼠肺组织有少量 iNOS 表达,内毒素休克时全身多种器官中以肺组织 iNOS 表达最为显著,p38 MAPK 信号通路参与了内毒素休克时 iNOS 表达的发生。提示肺有可能是休克时多器官功能不全综合征发生最早的始动器官之一,阻断 p38 MAPK 信号通路为防治内毒素休克提供了一条新途径。

**【关键词】** 休克;脂多糖类;一氧化氮合酶;磷酸转移酶素;多器官功能衰竭;小鼠

## Role of p38 MAPK in iNOS expression of lung tissues induced by LPS in BALB/c mice

KAN Wenhong, YAN Wensheng, JIANG Yong, HUANG Qiaobing,  
WANG Jingzhen, WANG Shiwen, ZHAO Kesen

PLA Key Lab for Shock and Microcirculation, the First Military Medical  
University, Guangzhou 510515, China

**【Abstract】** Objective To study the change of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in lung tissues of BALB/c mice induced by lipopolysaccharides(LPS) for exploring the role of p38 MAPK in gene regulation. Methods Three groups of BALB/c mice were used to reproduce an endotoxic shock model for observation of the time course and LPS dose-effect relationship between shock development and iNOS expression in tissues, and for investigating the role of p38 MAPK in iNOS expression, respectively. After treatment with LPS, the blood samples and tissues of animals were collected. NO in plasma was measured by Griess method, and iNOS protein and mRNA of tissues were detected by Western blotting and RT-PCR, respectively. p38 MAPK activity was measured by immunokinase assay method. Results ① Unlike saline-treated mice, mice injected with LPS showed a progressive decline in arterial pressure and 6h later the animals were in severe shock. ② Low level expression of iNOS was detected in normal lung tissues. In comparison with that in normal group, NO level in plasma and expression of iNOS protein, as well as mRNA in lung tissues were increased time-dependently and dose-dependently in LPS-treated animals. ③ The iNOS expression in lung appeared more early and

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(编号 G2000057004),国家杰出青年科学基金(编号 39925014),国家自然科学基金重点项目(编号 30030060;编号 39830400),国家自然科学基金资助项目(编号 30070735),广东省科技攻关项目(编号 2KM04702S),军队“十五”重点课题(编号 01Z044)

作者单位:510515 广州,第一军医大学全军休克微循环重点实验室(阚文宏,闫文生,姜勇,黄巧冰,王静珍,赵克森);100853 北京,中国人民解放军总医院老年心血管病研究所(王士雯)

作者简介:阚文宏,女,医学博士,讲师

通讯作者:赵克森,电话:020-85748232 E-mail:zhaoks@fimmu.edu.cn

apparently in the tissue of heart, liver, spleen, lung and intestine than other tissues. ④ p38 MAPK activity was increased in lung tissues stimulated by LPS and pretreatment with SB 203580, an inhibitor of p38 MAPK. The latter could partially inhibit LPS-induced NO production in plasma and the expression of iNOS protein and mRNA in lung, but it did not show any significant effect on arterial pressure. **Conclusions** Under normal conditions, the expression level in iNOS in lung tissue is low. The increase of iNOS expression is also found in multiple organs and the most apparent one is in the lung during endotoxic shock. p38 MAPK is involved in the signal transduction of iNOS expression after LPS stimulation. This indicates that lung may act as an initial organ in the pathogenesis of MODS.

**【Key words】** Shock; Lipopolysaccharides; Nitric oxide synthase; Phosphotransferases; Multiple organ failure; Mice

革兰阴性菌的脂多糖(LPS)在导致休克的同时,可以诱导组织产生诱导型一氧化氮合酶(iNOS)及一系列细胞因子的表达,带来休克病情恶化和多器官功能不全综合征(MODS)<sup>[1-6]</sup>。第一军医大学休克微循环实验室曾证明,休克时 iNOS 激活引起大量一氧化氮(NO)释放,导致过氧化亚硝酸根(ONOO<sup>-</sup>)生成,带来重症休克、血管平滑肌超极化和血管反应性低下,使血压难以提升和病情恶化<sup>[7-9]</sup>。然而,iNOS 在内毒素休克多种器官组织中表达的差异和其机制尚未完全阐明。本研究复制了小鼠内毒素休克模型,研究了 iNOS 在组织中的表达及 p38 MAPK 信号转导通路在其发生中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 动物和试剂** 实验用无特殊病原体 BALB/c 雄性小鼠 39 只(10 周龄,20~22g),由第一军医大学实验动物中心提供。LPS(来源于大肠埃希菌 055:B5 菌株)和 SB 203580,均购自 Sigma 公司;结合了琼脂糖的 p38 MAPK 的多克隆抗体、小鼠 iNOS 单克隆抗体和羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体,购自 Santa Cruz 公司;Oligo(dT)<sub>12-18</sub>,M-MLV 反转录酶和 Taq DNA 聚合酶,分别购自 Promega 和宝生物公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜和 RNA 提取试剂 Tripure,购自 Boehringer Mannheim 公司;PCR 引物由上海生物工程公司合成;γ-<sup>32</sup>P-ATP 购自北京亚辉生物工程公司;ECL 化学发光试剂为上海博彩生物工程公司产品;重组 GST-ATF2 和 6×His-p38 融合蛋白按常规提取和制备;其余均为国产分析纯试剂。

**1.2 小鼠内毒素休克模型的复制与分组** 第 1 组动物,复制小鼠内毒素休克模型,观察血压变化的时间曲线及 LPS 诱导的 iNOS 表达的时间过程。观察模型用的小鼠( $n=3$ )经戊巴比妥钠(60mg/kg)腹腔注射麻醉,在立体分离显微镜(SMZ-1B, Nikon)下,将 PE50 聚乙烯管插入一侧颈总动脉,用 4 道生理记录仪监测和记录血压。记录正常动脉血压后,腹腔注射 LPS(5mg/kg)6h 后经眼球或者动脉插管收集血

液;处死后,立即取出组织,液氮速冻,-70℃保存,用于 Western 印迹法、RNA 提取及激酶活性检测。观察 LPS(5mg/kg)诱导的 iNOS 表达的时间过程时,LPS 处理时间分别为 0、4、6、12、24、36、48、72h,每一个时间点取 3 只小鼠。

第 2 组动物观察 LPS 与 iNOS 表达的剂量-效应关系,分别用 2.5、5.0、10.0、20.0mg/kg 剂量的 LPS 处理小鼠,6h 后处死动物采取组织标本,每剂量组用 3 只小鼠。

第 3 组动物观察 SB 203580 的抑制作用,用 SB 203580(12.5、25.0mg/kg)给小鼠灌胃后 60min,再用 5.0mg/kg LPS 处理小鼠至重度休克,用同样的方法处死动物并观察组织中 iNOS 的表达。每剂量组 3 只小鼠。

**1.3 血浆中 NO 水平检测** 血浆中 NO 水平检测采用 Griess 法。将血样本在 1 500×g 离心 10min,血浆中的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>的浓度采用改良 Griess 法在 546nm,用紫外分光光度计比色测定<sup>[1,2,9,10]</sup>。

**1.4 iNOS 蛋白检测** 组织中 iNOS 蛋白检测采用 Western 印迹法。取 30mg 组织加入 0.5ml 细胞裂解液[0.05mol/L Tris-HCl, pH 7.6, 0.1mol/L NaCl, 0.01mol/L EDTA, 1mg/L 抑蛋白酶肽(aprotinin), 1mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)],冰上匀浆。以牛血清白蛋白为标准,取小部分样品采用 Brodard 行总蛋白定量,其余样品加入等量 2×十二烷基硫酸钠(SDS)[0.1mol/L Tris-HCl, pH 6.8; 0.2mol/L 二硫苏糖醇(DTT); 4% SDS; 0.2% 溴酚蓝; 20% 甘油],样品 100℃煮沸 5min,室温超声粉碎 1min,室温下 10 000×g 离心 10min,样品经 7% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)凝胶分离,每份样品上样 50μg 总蛋白,将蛋白用半干电转仪(瑞典 Pharmacia Biotech 公司)转到 PVDF 膜上。PVDF 膜室温下用 TTBS(0.1mol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% 吐温-20)封闭 1h,膜用小鼠 iNOS 单克隆抗体(1:500)室温孵育 2h,TTBS 洗涤 3 次,每次 10min。室温下膜用羊抗小鼠 IgG-HRP 第二抗体(1:1 500)孵

育 1h, TTBS 洗膜 3 次, 每次 10min, 加入化学发光试剂。暗室中曝光 X 射线胶片, 胶片经显影和定影, 蛋白带用凝胶图像分析仪 (Vilber Lourmat) 分析和定量。

**1.5 iNOS mRNA 表达的测定** 组织中 iNOS mRNA 表达采用 RT-PCR 法测定。用 RNA 提取试剂 Tripure, 按厂家说明提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA 第一条链, 反应体系为: 5 $\mu$ g 总 RNA, 0.2 $\mu$ g Oligo(dT)<sub>12-18</sub>, 100U 的 M-MLV 逆转录酶, 20U 的 RNasin, 加反转录缓冲液至总体积 20 $\mu$ l。37 $^{\circ}$ C 反应 1h, 95 $^{\circ}$ C 变性 5min。取逆转录产物 4 $\mu$ l 进行 PCR 反应 (94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 55 $^{\circ}$ C 复性 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 30 个循环)。组织中 iNOS (GenBank 登录号: AF065923) 的引物为: 5'-GAAACAACAGGAACCTACCA-3' 和 5'-TCCATGCAGACAACCTTGG-3', 扩增片段长度为 1 098bp; 扩增内对照 GAPDH (GenBank 登录号: NM-008084) 的引物为: 5'-CCCATCACCATCTTCCAGGA-3' 和 5'-TGCTTCACCACCTTCTTGAT-3', 扩增片段长度为 575bp。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色显示, 用凝胶图像分析系统进行半定量和照相。

**1.6 p38 MAPK 激酶活性检测**<sup>[20]</sup> 将组织中加入冰预冷的细胞裂解液 (25mmol/L HEPES (pH7.6), 137mmol/L NaCl, 2mmol/L EDTA, 1mmol/L EGTA, 3mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸 ( $\beta$ -glycerolphosphate), 1mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 1 $\mu$ g/ml 抑蛋白酶肽, 1mmol/L PMSF), 冰上匀浆后, 超声粉碎, 4 $^{\circ}$ C, 10 000 $\times g$  离心 5min, 取上清 300 $\mu$ l (约含蛋白 300 $\mu$ g), 加入结合有琼脂糖的 p38 MAPK 的多克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 摇动过夜, 4 $^{\circ}$ C 离心 30s, 沉淀用 500 $\mu$ l 细胞裂解液洗涤 2 次, 500 $\mu$ l 激酶反应缓冲液洗涤 1 次, 沉淀加入 20 $\mu$ l 激酶反应体系 (含 250 $\mu$ mol/L ATP, 10 $\mu$ g ATF2, 10 $\mu$ Ci  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP) 中, 37 $^{\circ}$ C 反应 30min, 加入 10 $\mu$ l 4 $\times$  SDS 加样缓冲液终止反应, 样品煮沸 5min, 离心, 取上清 20 $\mu$ l 用 12% SDS-PAGE 进行电泳, 干胶, 用 X 射线片于暗盒中 -70 $^{\circ}$ C 曝光 12h, 胶片经显影、定影, 图像用凝胶图像分析系统进行照相和分析。

**1.7 统计分析** 采用 SPSS 软件包进行统计分析及作图, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$ , 在统计学上有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 LPS 对 BALB/c 小鼠动脉血压的影响

正常小鼠平均动脉压为 (127.5  $\pm$  9.0) mmHg (1mmHg = 0.1333kPa), 小鼠腹腔注射 LPS (5.0mg/kg) 10min 时, 降至 (102.8  $\pm$  6.8) mmHg, 30min 回升至 (111.8  $\pm$  7.5) mmHg, 60min 时再次下降至 (93.8  $\pm$  5.2) mmHg, 120min 时持续下降到 (63.8  $\pm$  3.8) mmHg, 220min 时为 (52.5  $\pm$  4.5) mmHg, 300min 时为 (51.0  $\pm$  3.0) mmHg, 在小鼠腹腔注射 LPS 后 360min, 平均动脉压仅有 (42.0  $\pm$  3.0) mmHg, 提示 LPS (5.0mg/kg) 刺激 6h 后导致小鼠重度休克。

**2.2 LPS 诱导的小鼠血浆中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的浓度变化** BALB/c 小鼠血中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 在 2.5mg/kg 的 LPS 作用 6h 就有升高, 5.0mg/kg 时显著升高, 20mg/kg 达到最高 (图 1)。按休克模型选择的 LPS 剂量为 5.0mg/kg, 血中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的含量随着作用时间延长而增高, 4h 后的水平显著升高, 一直维持到 72h (图 2); 用 p38 MAPK 的特异性抑制剂 SB 203580 (12.5mg/kg) 后, 血中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

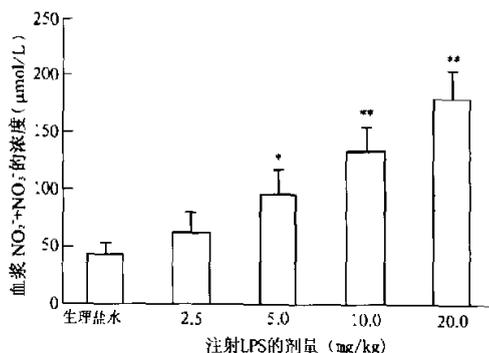


图 1 LPS 注射的剂量与血浆 NO 变化的剂量-效应关系

注: 每一组为 5 个样本。与生理盐水组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

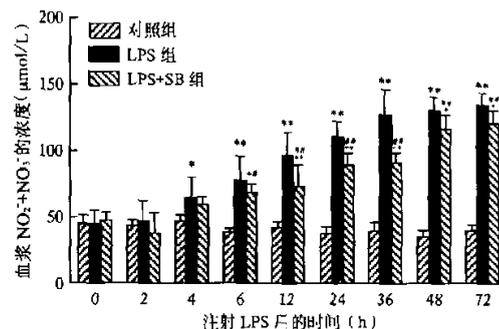


图 2 LPS 注射引起血浆 NO 变化的时间过程

注: 每一组为 5 个样本。与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组比较, +  $P < 0.05$ , ++  $P < 0.01$ ; SB 203580 处理组与对照组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

水平的升高可以被抑制,其中6~36h抑制作用显著( $P < 0.01$ ),48h之后有减弱的趋势;但是6h后,被SB抑制后的 $NO_2^- + NO_3^-$ 水平仍然显著高于对照组,且在统计学上差异明显( $P < 0.05$ )。

**2.3 LPS 诱导的小鼠肺组织 iNOS 蛋白和 mRNA 表达的时间-效应关系** 本研究中发现,正常对照组小鼠的肺组织就有少量 iNOS 蛋白表达,腹腔注射 LPS 4h 后, iNOS 蛋白表达显著增加,12~48h, iNOS 蛋白的表达进一步增加,并维持在较高水平(图 3)。

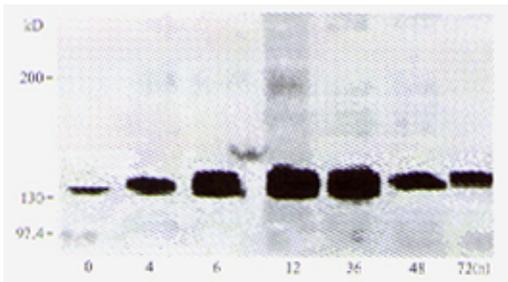


图 3 Western 印迹法分析 LPS 诱导的小鼠肺组织 iNOS 蛋白表达的时间过程

注:ID=0.992 1u

正常对照组小鼠肺组织中 iNOS mRNA/GAPDH mRNA 比值约为 0.05,腹腔注射 LPS 后 4h,两者比值增加到 0.78;6 和 12h 时,两者比值分别是 1.21 和 1.37;在 36 和 48h 时比值分别为 1.27 和 0.36;72h 则为 0.37,与蛋白表达的变化基本一致(图 4)。

**2.4 LPS 与小鼠肺组织 iNOS 蛋白和 mRNA 表达的剂量-效应关系** 在复制内毒素休克模型的过程中发现,5.0 mg/kg 的 LPS 6h 足以使小鼠达到重度休克,因此所选的作用时间均为 6h 以上。Western 印迹法和 RT-PCR 结果发现内毒素休克小鼠肺组织中 iNOS

蛋白和 mRNA 表达与 LPS 的剂量呈现明显的剂量-效应关系,其中 LPS 剂量为 2.5mg/kg 时, iNOS 蛋白表达量不明显,当 LPS 剂量达到 5.0 mg/kg 时, iNOS 的表达显著增加; LPS 在剂量为 10.0 和 20.0mg/kg 时, iNOS 的表达进一步增加。对照组的 iNOS mRNA/GAPDH mRNA 比值为 0.04; LPS 剂量为 2.5mg/kg 时,两者比值为 0.22; LPS 剂量为 5.0mg/kg 时,比值为 0.61;当 LPS 剂量增加到 10.0 和 20.0mg/kg 时,比值分别为 0.76 和 1.26(图 5、图 6)。

**2.5 SB 203580 对内毒素休克小鼠肺中 iNOS 蛋白和 mRNA 表达的影响** 与对照组相比,内毒素休克小鼠肺组织中 iNOS 蛋白和 mRNA 的表达显著增加。然而,分别用 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB 203580 5.0、12.5 和 25.0mg/kg 预处理小鼠后,肺组织中 iNOS 蛋白表达分别被抑制 21%、48%、75%; iNOS mRNA 的表达分别被抑制 37%、54% 和 67%(图 7)。

**2.6 LPS 刺激后 BALB/c 小鼠不同组织中 iNOS 表达** 按照内毒素休克模型的条件,小鼠腹腔注射 LPS(5.0mg/kg) 6h 后, iNOS 蛋白和 mRNA 可在心、肝、脾、肺、肾、肠等各组织中表达,其中以肺组织表达水平最高(图 8、图 9)。

**2.7 LPS 刺激后 BALB/c 小鼠肺组织中 p38 MAPK 活性测定** 小鼠在注射 LPS(5.0mg/kg) 30min 后,肺组织中 p38 MAPK 活性即有增高,120~180min 达高峰,240min 后活性下降(图 10)。

### 3 讨论

本实验复制小鼠内毒素休克模型,在体视显微镜下,把经过拉细的 PE50 导管插入小鼠颈动脉,用电血压换能器和 4 道生理记录仪记录血压曲线。可见小鼠正常平均动脉压(MAP)为 127.5mmHg, 脉压差达

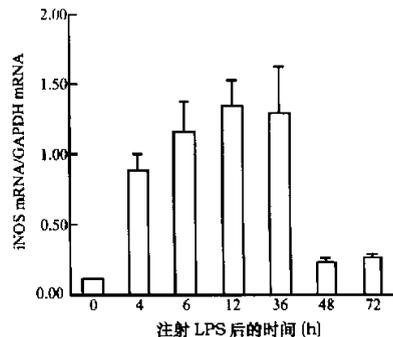
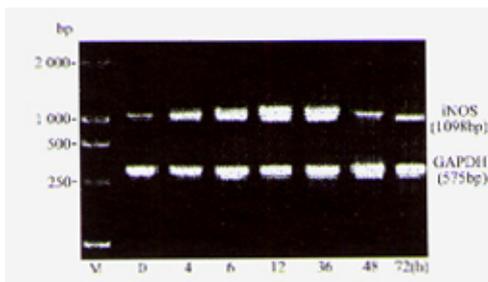
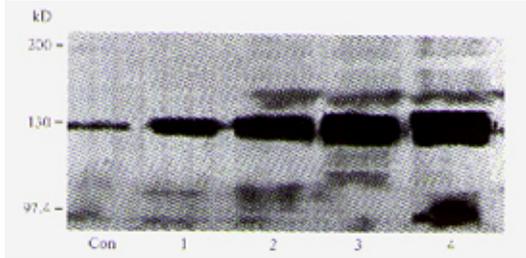


图 4 RT-PCR 分析 LPS 诱导的小鼠肺组织 iNOS mRNA 表达的时间过程

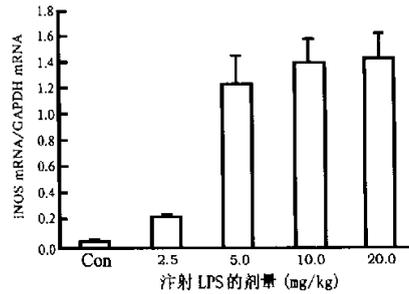
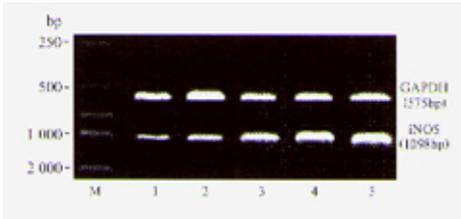


**图 5** Western 印迹法分析腹腔注射 LPS 剂量与 BALB/c 小鼠肺组织 iNOS 蛋白表达的剂量-效应关系  
注:每个时间点 5 个样本。Con: 对照组; 1: 2.5mg/kg LPS 组; 2: 5.0 mg/kg LPS 组; 3: 10.0mg/kg LPS 组; 4: 20.0mg/kg LPS 组  
注: ID=0.9921u

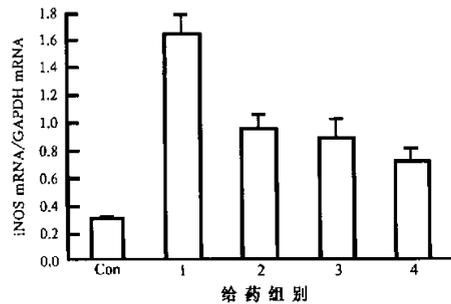
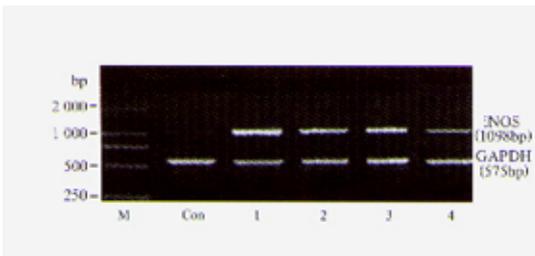
35~40mmHg, LPS 作用后呈典型的双峰型下降, 6h 降至 42.0mmHg, 从而复制出典型的小鼠内毒素休克模型。用此模型可以观察多种休克和疾病状态时各种器官的细胞内变化, 而且由于小鼠体重轻, 用药量少, 这种休克模型为贵重试剂和药物(如 SB 203580、PD 98059、单克隆抗体等)的在体研究提供了可能性。文献报道的研究, 多数是从离体细胞水平证实 LPS 诱导的 iNOS 表达<sup>[23,24]</sup>; 本研究是从整体水平, 观察

了小鼠内毒素休克时组织中 iNOS 表达及信号通路在其中的作用, 更接近实际的病理状态。

许多研究发现肺组织中的多种细胞包括神经纤维、内皮细胞、气道上皮细胞以及培养的上皮细胞系在未受任何刺激的情况下 nNOS 和 eNOS 就可以表达<sup>[10-12]</sup>。本研究发现正常对照组小鼠肺中就有少量 iNOS 表达。文献报道正常人气道上皮以及大鼠肺巨噬细胞也可以表达 iNOS<sup>[13-15]</sup>。估计 iNOS 并非是正常肺组织固有的合酶, 它在正常的气道和肺中出现, 主要由于肺是一个开放性的器官, 直接与外界相通, 从而受到少量 LPS 或其他物质诱导所致。注射 LPS 后, 检测的所有组织中, iNOS 在肺中表达最早、水平最高, 并且存在着时间-效应和剂量-效应关系。笔者在对 ICAM-1 表达的研究中, 也有类似所见<sup>[19]</sup>。在正常小鼠的肺组织中同样可以检测到 ICAM-1 的表达, LPS 作用后肺组织 ICAM-1 表达最多。这些证据表明, 肺作为一个开放性器官受细菌及毒素作用, NOS 和 ICAM-1 等体液因子表达旺盛, 通过自分泌和旁分泌机制, 作用于组织细胞, 使肺组织很有可能是 MODS 发生较早的始动器官之一。



**图 6** RT-PCR 分析腹腔注射 LPS 的剂量与 BALB/c 小鼠肺组织 iNOS mRNA 表达的剂量-效应关系  
注:每个时间点 5 个样本。右图 Con: 对照组



**图 7** RT-PCR 分析 SB 203580 对 LPS 诱导的 BALB/c 小鼠 iNOS mRNA 表达的影响  
注:每个剂量组做 5 个样本。M: DNA 分子量标准; Con: 对照组; 1: LPS(5.0mg/kg) 组; 2: SB 203580(5.0mg/kg) + LPS(5.0mg/kg) 组; 3: SB 203580(12.5mg/kg) + LPS(5.0mg/kg) 组; 4: SB 203580(25.0mg/kg) + LPS(5.0mg/kg) 组

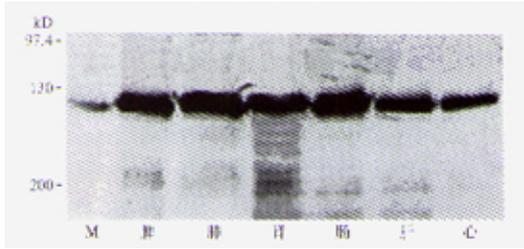


图8 Western印迹法分析内毒素休克小鼠不同组织 iNOS 蛋白表达 注:1D=0.992 1u

探讨 iNOS 表达和诱导的细胞和分子机制,研究者们大多数采用 iNOS 的特异性和(或)非特异性抑制剂以及基因敲除等方法<sup>[3-5]</sup>,目前尚未有突破性进展。最近报道表明, MAPKs 可能参与了多种炎症介

质导的信号转导<sup>[16-18]</sup>。少量文献报道, p38 MAPK 参与了 LPS 刺激离体细胞 iNOS 的表达<sup>[21,22]</sup>。笔者在内毒素休克整体实验发现动物注射 LPS 后,细胞和组织中的 iNOS 表达增加的同时, p38 MAPK 也被显著激活,用 p38 MAPK 的特异性抑制剂 SB 203580 作用于内毒素休克小鼠,可以部分抑制由 LPS 引起的肺组织 iNOS 的表达,并可降低血中 NO 水平。但是 SB 处理的动物在 LPS 作用后,血中 NO 水平仍显著高于对照组,而且对动物的血压下降并无显著影响。这些均表明内毒素休克动物 iNOS 的表达只是部分通过 p38 MAPK 这条信号转导途径,有可能还有其他途径参与,其详细通路有待进一步研究。

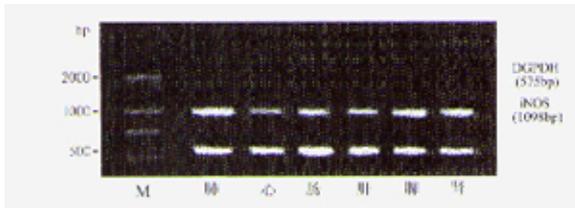


图9 RT-PCR 分析内毒素休克小鼠不同组织 iNOS mRNA 的表达

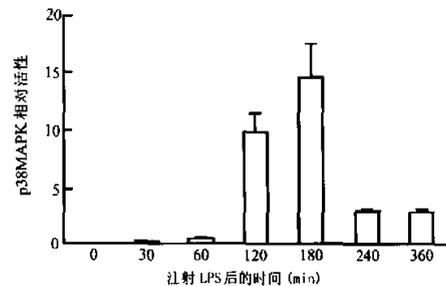
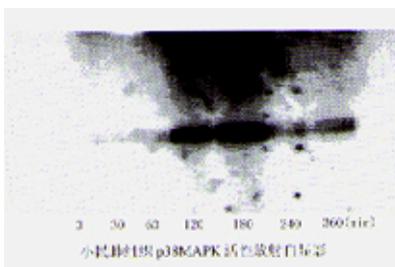
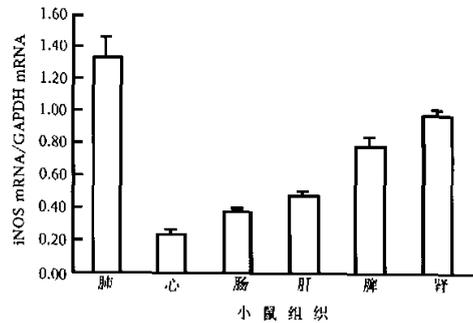


图10 LPS 对 BALB/c 小鼠肺组织 p38MAPK 活性的影响

参考文献

- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982, 126:131-138.
- Luss H, Nussler NC, Beger HG, et al. Expression and de-

- tection of inducible nitric oxide synthase in experimental models of inflammation. *Methods*, 1996, 10:51-60.
- Akaike T, Noguchi Y, Ijiri S, et al. Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:2448-2453.

- 4 Kristof AS, Goldberg P, Laubach V, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158: 1883-1889.
- 5 Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991, 43: 109-142.
- 6 Fang FC. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest*, 1997, 99: 2818-2825.
- 7 Zhao KS, Liu J, Yang GY, et al. Peroxynitrite leads to arteriolar smooth muscle cell membrane hyperpolarization and low vasoreactivity in severe shock. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2000, 23: 259-267.
- 8 杨贵远, 赵克森, 刘杰, 等. 过氧化亚硝酸根参与重症休克血管反应性低下的发生. *中华创伤杂志*, 2000, 16: 293-296.
- 9 杨贵远, 赵克森, 刘杰. 一氧化氮降低失血性休克血管反应性的机制. *中国病理生理杂志*, 2000, 16: 1163-1166.
- 10 Asano K, Chee CB, Gaston B, et al. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 10089-10093.
- 11 Kobzik L, Brecht DS, Lowenstein CJ, et al. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993, 9: 371-377.
- 12 Shaul PW, North AJ, Wu LC, et al. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest*, 1994, 94: 2231-2236.
- 13 Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, et al. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7809-7813.
- 14 Liu HW, Anand A, Bloch K, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase by macrophages in rat lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 156: 223-228.
- 15 Fujii Y, Goldberg P, Hussain SN. Contribution of macrophages to pulmonary nitric oxide production in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157: 1645-1651.
- 16 Saldeen J, Lee JC, Welsh N. Role of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in cytokine-induced rat islet cell apoptosis. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61: 1561-1569.
- 17 Jeon YJ, Han SB, Lee SH, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by angelin in murine macrophages. *Int Immunopharmacol*, 2001, 1: 237-245.
- 18 Chan ED, Riches DW. IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38 MAPK in a mouse macrophage cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 280: C441-450.
- 19 闫文生, 阚文宏, 黄巧冰, 等. 内毒素休克小鼠肺组织 ICAM-1 的表达及 p38 MAPK 的调控作用. *中华医学杂志*, 2001, 81: 1132-1133.
- 20 闫文生, 姜勇, 黄巧冰, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶活性放射自显影测定方法的建立和应用. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28: 410-414.
- 21 Chae HJ, Kim SC, Chae SW, et al. Blockade of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 expression in MC3T3E-1 osteoblasts. *Pharmacol Res*, 2001, 43: 275-283.
- 22 Ajizian SJ, English BK, Meals EA. Specific inhibitors of p38 and extracellular-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ . *J Infect Dis*, 1999, 179: 939-944.
- 23 Miles PR, Bowman L, Rao KMK, et al. Pulmonary surfactant inhibits LPS-induced nitric oxide production by alveolar macrophages. *Am J Physiol*, 1999, 276: L186-L196.
- 24 Hori M, Kita M, Torihashi S, et al. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 280(5): G930-G938.

(收稿日期: 2002-02-19)

(本文编辑 李娜)