

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00738

## 血液滤过联合灌流治疗对重症急性胰腺炎继发肺损伤患者血清 TNF- $\alpha$ 及血管内皮细胞 RhoA 磷酸化修饰的影响

郑倩<sup>1</sup>, 杜晓刚<sup>1\*</sup>, 陈雪梅<sup>2</sup>, 李正荣<sup>1</sup>, 龚颖<sup>1</sup>, 何俊伶<sup>1</sup>

1. 重庆医科大学附属第一医院肾内科, 重庆 400016

2. 重庆医科大学附属第一医院重症医学科, 重庆 400016

**[摘要]** **目的** 探讨血液滤过联合血液灌流(HF+HP)治疗对重症急性胰腺炎(SAP)继发肺损伤患者血清中 TNF- $\alpha$  的清除作用及对内皮细胞中 RhoA 的 188 位丝氨酸磷酸化修饰(p-RhoA)的影响。**方法** 选取 35 例 SAP 患者纳入实验研究, 其中 SAP 继发急性肺损伤(ALI)/急性呼吸窘迫综合征(ARDS) 28 例, 未继发 ALI/ARDS 7 例, 同时设正常对照组 20 例。全部 SAP 患者收入中心 ICU 治疗, 其中 9 例 SAP 继发 ARDS 患者给予连续性静脉-静脉血液滤过(CVVH)联合 HP 治疗(HF+HP 组)。应用 ELISA 法检测不同程度肺损伤的 SAP 患者血清中 TNF- $\alpha$  水平的变化, 以及采用 HF+HP 治疗的 9 例 SAP 继发 ARDS 患者治疗不同时间点血清中 TNF- $\alpha$  的浓度。体外实验采用 HF+HP 治疗不同时间点患者的血清分别刺激体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVECs), 并以重组人 TNF- $\alpha$  刺激细胞作为阳性对照, 蛋白质印迹分析检测各组 HUVECs 中 p-RhoA 与总 RhoA 蛋白的表达, 免疫荧光染色观察 p-RhoA 在细胞内的分布。**结果** 与未继发 ALI/ARDS 患者比较, SAP 继发 ALI/ARDS 的患者血清中 TNF- $\alpha$  水平明显升高( $P < 0.05$ ), 尤以继发 ARDS 的患者升高最为明显(约为正常对照组的 7 倍)。采用 HF+HP 治疗的 9 例 SAP 继发 ARDS 患者治疗 6 h 后, 血清中 TNF- $\alpha$  水平与 HF+HP 治疗前比较开始下降, 至治疗 20 h 下降最为明显, 接近正常组水平; HF+HP 治疗后, SAP 继发 ARDS 患者动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 水平、氧合指数(PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>)均较治疗前上升( $P < 0.05$ )。蛋白质印迹分析结果表明, HF+HP 治疗后 SAP 继发 ARDS 患者血清诱导的 HUVECs 中 p-RhoA 水平逐渐升高( $P < 0.05$ ), 但各组 RhoA 总蛋白表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。免疫荧光结果显示, 在 HUVECs 中, p-RhoA 主要分布在细胞质, 各组变化趋势与蛋白质印迹分析结果一致。**结论** SAP 继发 ALI/ARDS 患者血循环中存在高水平的 TNF- $\alpha$ 。HF+HP 治疗可有效地清除 SAP 继发 ALI/ARDS 患者血液中大量生成的 TNF- $\alpha$ , 并抑制 RhoA 的活化, 从而起到降低内皮细胞高通透性的作用。

**[关键词]** 血液滤过; 血液灌流; 重症急性胰腺炎; 肺损伤; 内皮细胞; RhoA; 肿瘤坏死因子  $\alpha$

**[中图分类号]** R 576.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2013)07-0738-07

### Effect of hemofiltration combined with hemoperfusion on serum TNF- $\alpha$ in severe acute pancreatitis patients with lung injury and on RhoA serine 188 phosphorylation in endothelial cells

ZHENG Qian<sup>1</sup>, DU Xiao-gang<sup>1\*</sup>, CHEN Xue-mei<sup>2</sup>, LI Zheng-rong<sup>1</sup>, GONG Ying<sup>1</sup>, HE Jun-ling<sup>1</sup>

1. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Emergency, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of hemofiltration plus hemoperfusion (HF+HP) on removal of serum TNF- $\alpha$  in severe acute pancreatitis (SAP) patients with lung injury and on RhoA serine 188 phosphorylation (p-RhoA) in endothelial cells. **Methods** Totally 35 SAP patients, including 28 with acute lung injury (ALI)/ acute respiratory distress syndrome (ARDS), and 20 healthy subjects were involved in this study. All the SAP patients were treated in ICU, and the 9 combined with ARDS underwent continuous veno-venous hemofiltration (CVVH) and HP therapy (HF+HP group). The serum TNF- $\alpha$  in SAP patients with different degrees of lung injury and the serum TNF- $\alpha$  in SAP patients with ARDS was determined by ELISA at different time points during HF+HP. For *in vitro* study the human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were

**[收稿日期]** 2013-02-26 **[接受日期]** 2013-06-08

**[基金项目]** 重庆市教委科研资助项目(KJ100318), 重庆市科委资助项目(cstc2012jjA10136), 重庆市卫生局重点资助项目(2011-1-016). Supported by Program of Chongqing Education Committee (KJ100318), Program of Chongqing Science and Technology Committee (cstc2012jjA10136), and Key Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-1-016).

**[作者简介]** 郑倩, 硕士生. E-mail: zqhnxy75@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-89012316, E-mail: dxgexm@163.com

treated with sera from SAP patients with ARDS during HF+HP, and those treated with recombinant TNF- $\alpha$  were taken as a positive control. The changes of p-RhoA and total RhoA were observed by Western blotting analysis. Subcellular distribution of p-RhoA protein was observed by immunofluorescence staining. **Results** We found that, compared with SAP patients without ALI/ARDS, those with ALI/ARDS, especially those with ARDS (about 7 folds that of the normal control) had a significantly increased serum TNF- $\alpha$  level ( $P < 0.05$ ). The serum TNF- $\alpha$  level began to decrease in the 9 SAP patients with ARDS 6 h after HF+HP treatment, with the decrease reached maximal 20 h after treatment, closing to the level of the normal control group. Meanwhile, the arterial blood PaO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio were significantly elevated after HF+HP treatment in SAP patients with ARDS ( $P < 0.05$ ). Western blotting analysis showed that p-RhoA level was significantly increased in HUVECs treated with the serum of HF+HP-treated SAP patients with ARDS ( $P < 0.05$ ), and the total RhoA protein expressions were not significantly different among different groups ( $P > 0.05$ ). Immunofluorescence indicated that p-RhoA was largely distributed in the cytoplasm of HUVECs, and the changes were consistent with the data from Western blotting analysis. **Conclusion** SAP patients with ALI/ARDS have high circulation TNF- $\alpha$ . Treatment with HF+HP can effectively remove the excessive TNF- $\alpha$  in the blood of SAP patients with ALI/ARDS and inhibit activation of RhoA, subsequently decreasing the high permeability of endothelial cells.

**[Key words]** hemofiltration; hemoperfusion; severe acute pancreatitis; lung injuries; endothelial cells; RhoA; tumor necrosis factor-alpha

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(7): 738-744]

急性肺损伤 (ALI)/急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 是重症急性胰腺炎 (SAP) 患者最常见的并发症和最重要的死亡原因<sup>[1-2]</sup>。血管内皮细胞损伤可介导肺微血管通透性增加, 引起肺水肿, 并继发低氧血症, 从而导致 ALI/ARDS 的发生<sup>[1,3]</sup>。近年来研究发现, 连续性血液净化治疗 (CBP) 在抢救各种危重症患者包括 SAP、败血症, 甚至多器官功能障碍综合征 (MODS) 中显示出一定的优势, 其机制被认为与对炎性细胞因子的清除有关<sup>[4-6]</sup>。我们在既往的研究中发现, 用 SAP 患者 CBP 治疗前的血清刺激人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 后, 调节内皮细胞通透性的最重要的活性蛋白——细胞内 GTP-RhoA 表达明显增加, 肌动蛋白细胞骨架 F-actin 发生重构, 内皮细胞通透性明显增高; 而经过 CBP 治疗后, 用 SAP 患者血清刺激的 HUVECs 中 GTP-RhoA 表达减少, 且 F-actin 重构减轻, 内皮高通透性得到改善<sup>[7]</sup>。但是 CBP 治疗改善内皮通透性的效应是否与其清除炎症介质并调节内皮细胞 188 位丝氨酸磷酸化的 RhoA (p-RhoA)——一种可稳定 RhoA 非活化形式的蛋白质修饰形式的变化有关, 目前仍不清楚。

TNF- $\alpha$  在 ALI/ARDS 早期发病中起到关键的作用, 被称为“早期反应因子”<sup>[3]</sup>。本研究中我们以 TNF- $\alpha$  为切入点, 检测 SAP 患者血清中 TNF- $\alpha$  水平及血液滤过 (HF) 联合血液灌流 (HP) 治疗前后 TNF- $\alpha$  的变化, 以证实 SAP 患者血清中 TNF- $\alpha$  的水平与 ALI/ARDS 发病的关系; 并用 SAP 继发肺

损伤患者 HF+HP 治疗前及治疗后的血清刺激 HUVECs, 以模仿 SAP 患者血管内皮细胞损伤的体内环境, 观察 HF+HP 治疗对 RhoA 蛋白的表达及 p-RhoA 的影响, 以进一步探讨 HF+HP 治疗改善 SAP 继发肺损伤患者内皮通透性的机制。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 研究对象为 2011 年 5 月至 2012 年 5 月我院中心 ICU 收治的 SAP 患者。入选标准: (1) SAP 诊断均符合中华医学会外科学会胰腺学组制订的急性胰腺炎临床诊断及分级标准; (2) SAP 继发 ALI/ARDS 患者均出现呼吸障碍, ALI/ARDS 诊断符合 1994 年欧美联席会议提出的 ALI/ARDS 诊断标准; (3) 非手术治疗患者; (4) 既往无心、肺、肾等重要脏器疾患; (5) 急性病理生理和慢性健康状况评分 (APACHE)  $\geq 8$  或序贯性脏器衰竭评分 (SOFA)  $\geq 2$ 。共 35 例患者纳入本研究。其中 28 例继发 ALI/ARDS, 男 19 例、女 9 例, 年龄 19~73 (46.6 $\pm$ 11.6) 岁, 诊断为 ALI 12 例, ARDS 16 例; 其余 7 例未伴发 ALI/ARDS, 男 2 例、女 5 例, 年龄 32~56 (48 $\pm$ 13.8) 岁。全部患者均同时伴有其他并发症, 包括急性肾损伤、肝功能不全或凝血功能异常等, 其中 14 例 SAP 患者入院时合并 MODS, 其中 1 例经治疗无效死于心力衰竭, 其余 34 例 SAP 患者均治愈。另选择来自我院体检中心的健康体检者 20 例作为对照, 其中男 10 例、女 10 例, 年龄 25~50

(40.3±7.0)岁。35例SAP患者入院后均进行常规内科治疗,包括禁食、胃肠减压、补液、抑制胰腺分泌、防治感染及对症治疗,必要时予机械通气等治疗。本研究经我院伦理委员会审查通过,并取得患者及健康志愿者的知情同意。

**1.2 HF+HP治疗方案** 本研究中,9例SAP继发ARDS患者给予连续性静脉-静脉血液滤过(CV-VH)联合HP治疗(HF+HP组)。HF+HP治疗使用德国贝朗Diapact CRRT机,采用股静脉置管建立血管通路,滤器采用Fresenius AV600s聚砜膜滤器(有效表面积1.4 m<sup>2</sup>,膜内径220 μm,超滤系数250 mL/h),灌流器采用中性大孔吸附树脂(HA-330,中国珠海健帆),串联于聚砜膜滤器之前。灌流持续2 h后取下灌流器,继续行血液滤过,滤过结束前再行2 h灌流。HF治疗采用无肝素方案,每30 min予200 mL生理盐水冲洗血流管道以抗凝。置换液采用前稀释法,置换液流量为2~3 L/h。血流量为200~300 mL/min,根据患者的具体病情调整超滤量。每次治疗时间20~24 h。于治疗前后记录患者的生命体征,并采集动脉血进行血气分析。

**1.3 血清收集及TNF-α水平检测** 全部研究对象治疗前于清晨抽取空腹外周血5 mL。9例行HF+HP治疗的SAP合并ARDS患者于治疗前、治疗6 h、治疗20 h时分别从滤器动脉端抽取全血5 mL标本。血液经1 000×g离心15 min收集上层血清。全部标本编号分装,-80℃保存。采用双抗体夹心ELISA法检测血清TNF-α水平,人TNF-α ELISA检测试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司,严格按试剂盒说明书操作。

**1.4 内皮细胞培养、分组及处理** HUVECs(ECV304)由重庆医科大学重庆市神经病学实验室提供。HUVECs生长于含10%FBS(Gibco公司)的RPMI 1640(HyClone公司)培养液中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱培养。待细胞铺满瓶底后,用0.25%胰酶-0.02%EDTA(Sigma公司)消化成单个细胞,传代培养,取对数生长期细胞进行实验。将HUVECs随机分为5组:正常对照组采用含10%正常对照组血清刺激细胞,HF+HP治疗前组、HF+HP治疗6 h组和HF+HP治疗20 h组分别用HF+HP治疗的SAP合并ARDS患者治疗前、治疗6 h或治疗20 h的血清刺激细胞,实验中同时以100

ng/mL重组人TNF-α(RayBiotech公司)刺激细胞作为阳性对照组。

**1.5 蛋白质印迹分析检测内皮细胞RhoA及p-RhoA表达** 细胞经前述分组干预6 h后用预冷PBS洗2次,于冰上加入0.8 mL冰冷的1×细胞裂解液[20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),150 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,1 mmol/L EGTA,1% Triton X-100,2.5 mmol/L sodium pyrophosphate,1 mmol/L β-glycerophosphate,1 mmol/L NaVO<sub>4</sub>,1 μg/mL leupeptin,使用时补加入1 mmol/L PMSF和1 mmol/L leupeptin,aprotinin,pepstatin],放置5 min,超声破碎仪下破碎细胞6~7次。在低温离心机中,以10 000×g离心30 min,取上清液用BCA法进行蛋白定量。15% SDS-PAGE凝胶电泳,转PVDF膜。5%脱脂奶粉常温封闭2 h,分别加入兔抗人p-RhoA多克隆抗体(Santa Cruz公司)、鼠抗人RhoA单克隆抗体(Sigma公司)或鼠抗人β-actin抗体(联科生物技术有限公司)4℃过夜。经辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(羊抗兔IgG、羊抗鼠IgG,联科生物技术有限公司)孵育后,用ECL化学发光法显色目的条带,采用胶片曝光。利用Quantity One软件分析目的条带的灰度值,以其与β-actin的灰度值之比作为目的蛋白的相对表达量。

**1.6 免疫荧光染色观察p-RhoA在细胞内的分布** 将HUVECs接种在置于24孔细胞培养板中的无菌盖玻片上,待细胞生长近50%融合时,经前述分组干预6 h。细胞用新鲜配制的4%多聚甲醛固定15 min,PBS洗3次;于室温用15%羊血清孵育10 min后,滴加特异性一抗:兔抗人p-RhoA抗体(1:100),4℃孵育过夜;阴性对照不加一抗。加入荧光素标记二抗:FITC标记的山羊抗兔IgG(1:100)室温孵育1 h(避光),每步骤后均用0.01 mol/L PBS(pH 7.4)充分洗涤。用抗荧光淬灭封片液固片,于激光共聚焦显微镜下观察结果。

**1.7 统计学处理** 全部数据采用Excel和SPSS 19.0软件进行统计学处理,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组资料比较采用单因素方差分析,两样本均数比较采用 $t$ 检验。检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

**2.1 不同程度肺损伤的SAP患者血清中TNF-α水平的变化** 为了观察SAP患者血循环中炎症因子

TNF- $\alpha$  的水平, 我们检测了全部 35 例 SAP 患者与正常对照组受试者血清中 TNF- $\alpha$  的浓度。结果(图 1)发现, 与正常对照组比较, 全部 35 例 SAP 患者组血清中 TNF- $\alpha$  的水平均升高( $P < 0.05$ )。然而, 与未继发肺损伤的 SAP 患者组比较, 继发 ALI/ARDS 的 SAP 患者组血清中 TNF- $\alpha$  的水平明显升高( $P < 0.05$ ), 其中以继发 ARDS 的 SAP 患者组升高最为明显(约为正常对照组的 7 倍)。

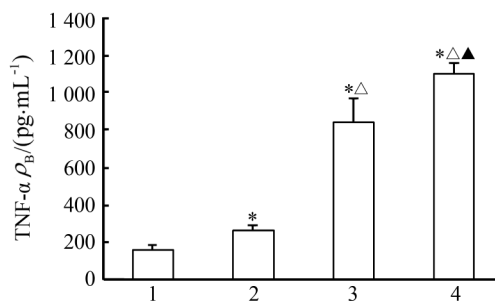


图 1 不同程度肺损伤的 SAP 患者血清 TNF- $\alpha$  水平变化

Fig 1 Changes of serum TNF- $\alpha$  in SAP patients with different degrees of lung injury

SAP: Severe acute pancreatitis; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; ALI: Acute lung injury; ARDS: Acute respiratory distress syndrome. 1: Control group ( $n=20$ ); 2: SAP without ALI/ARDS group ( $n=7$ ); 3: SAP with ALI group ( $n=12$ ); 4: SAP with ARDS group ( $n=16$ ). \*  $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs SAP without ALI/ARDS group;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs SAP with ALI group

2.2 HF+HP 治疗前后 SAP 合并 ARDS 患者生命体征及呼吸功能的变化 9 例 SAP 继发 ARDS 患者行 HF+HP 治疗前后其平均动脉压及心率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与 HF+HP 治疗前比较, 9 例患者治疗后体温、呼吸频率有一定程度下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。HF+HP 治疗前 9 例患者临床上均表现为进行性低氧血症和不同程度的呼吸窘迫, 部分患者予以面罩吸氧、无创或有创机械通气治疗。HF+HP 治疗后, 9 例患者动脉血氧分压 ( $\text{PaO}_2$ )、 $\text{HCO}_3^-$  水平、氧合指数 ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ) 较治疗前有所上升( $P < 0.05$ ), 但动脉血 pH 值、二氧化碳分压 ( $\text{PaCO}_2$ ) 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见表 1。

2.3 HF+HP 治疗过程中 SAP 合并 ARDS 患者血清 TNF- $\alpha$  水平的变化 为了明确 HF+HP 治疗对 SAP 合并 ARDS 患者血清 TNF- $\alpha$  的影响, 我们检测

了 9 例 SAP 合并 ARDS 患者 HF+HP 治疗前后不同时间点血清中 TNF- $\alpha$  的变化, 结果发现, 与正常对照组比较, HF+HP 治疗前 SAP 合并 ARDS 患者血清 TNF- $\alpha$  水平明显升高( $P < 0.05$ ), HF+HP 治疗 6 h 后血清 TNF- $\alpha$  水平较治疗前明显下降( $P < 0.05$ ), 但仍高于对照组( $P < 0.05$ ); HF+HP 治疗 20 h 后血清 TNF- $\alpha$  水平进一步降低, 与治疗前及治疗后 6 h 比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而接近正常对照组。详见图 2。

表 1 HF+HP 治疗前后 SAP 继发 ARDS 患者生命体征及氧合指数的变化

Tab 1 Changes of vital signs and arterial blood gas in SAP patients with ARDS before and after HF+HP therapy

$n=9, \bar{x} \pm s$

Index	Before HF+HP	After HF+HP
Mean artery pressure $p/\text{mmHg}$	97.00 $\pm$ 17.03	90.48 $\pm$ 5.63
Heart rate $f/\text{min}^{-1}$	112.89 $\pm$ 22.32	107.44 $\pm$ 24.34
Respiratory rate $f/\text{min}^{-1}$	28.44 $\pm$ 5.25	23.89 $\pm$ 4.7*
Body temperature $\theta/^\circ\text{C}$	36.94 $\pm$ 0.59	36.63 $\pm$ 0.62*
pH	7.33 $\pm$ 0.09	7.39 $\pm$ 0.05
$\text{PaO}_2$ $p/\text{mmHg}$	58.78 $\pm$ 24.80	98.00 $\pm$ 37.15*
$\text{PaCO}_2$ $p/\text{mmHg}$	33.68 $\pm$ 7.42	35.61 $\pm$ 3.85
$\text{HCO}_3^-$ $c_B/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	17.48 $\pm$ 4.38	22.57 $\pm$ 4.50*
$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$	170.24 $\pm$ 15.57	203.33 $\pm$ 46.50*

SAP: Severe acute pancreatitis; ARDS: Acute respiratory distress syndrome; HF+HP: Hemofiltration with hemoperfusion. 1 mmHg=0.133 kPa. \*  $P < 0.05$  vs before HF+HP

2.4 HF+HP 治疗对血管内皮细胞中 RhoA 及 p-RhoA 的影响 为了进一步验证 HF+HP 治疗是否通过有效清除 TNF- $\alpha$  减少 RhoA 的活化, 我们同时观察了 HF+HP 治疗对 HUVECs 中总 RhoA 及 p-RhoA 的影响。结果发现, 与正常对照组比较, HF+HP 组治疗前和治疗 6 h 时 HUVECs 中 p-RhoA 表达明显降低( $P < 0.05$ )。与 HF+HP 组治疗前相比, 治疗 6 h 时 HUVECs 中 p-RhoA 表达开始明显增加( $P < 0.05$ ), 而治疗 20 h 时中 p-RhoA 表达升高更为明显( $P < 0.05$ )。各组总 RhoA 蛋白表达水平相似, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。正常对照组 HUVECs 中 p-RhoA 约占总 RhoA 蛋白的一半, 然而 HF+HP 组治疗前 HUVECs 中 p-RhoA

占总 RhoA 蛋白不到 15%,治疗 20 h 时 p-RhoA 与总 RhoA 蛋白的比率与正常组相似,见图 3。

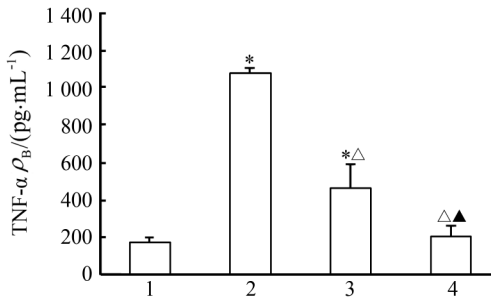


图 2 HF+HP 治疗不同时间点 SAP 合并 ARDS 患者血清中 TNF-α 含量变化

Fig 2 Changes of serum TNF-α in SAP patients with ARDS during HF+HP treatment

SAP: Severe acute pancreatitis; ARDS: Acute respiratory distress syndrome; TNF-α: Tumor necrosis factor-α. 1: Control group; 2-4: SAP with ALI group pre-HF+HP, 6 h-HF+HP, and 20 h-HF+HP. \* P<0.05 vs control group; △P<0.05 vs SAP with ARDS group pre-HF+HP; ▲P<0.05 vs SAP with ARDS group 6 h-HF+HP. n=9, x̄±s

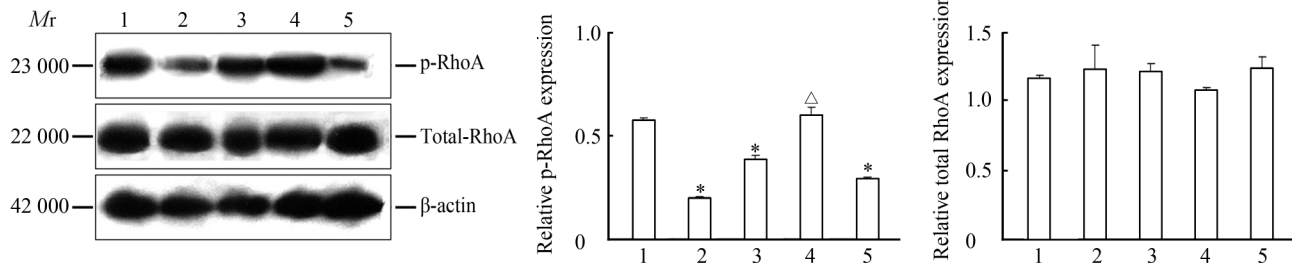


图 3 HF+HP 治疗不同时间点 SAP 患者血清诱导的内皮细胞 RhoA 及 p-RhoA 蛋白表达的变化

Fig 3 RhoA and p-RhoA protein expression in HUVECs treated with the sera of SAP patients before and at different time points after HF+HP treatment

HF+HP: Hemofiltration with hemoperfusion. SAP: Severe acute pancreatitis; HUVECs: Human umbilical vein endothelial cells. 1: Control; 2-4: Pre-, 6 h-, 20 h-HF+HP, respectively; 5: 100 ng/mL TNF-α. \* P<0.05 vs control group; △P<0.05 vs pre-HF+HP group. n=8 (control group and pre-HF+HP, 6 h-HF+HP, 20 h-HF+HP groups), n=3 (TNF-α group), x̄±s

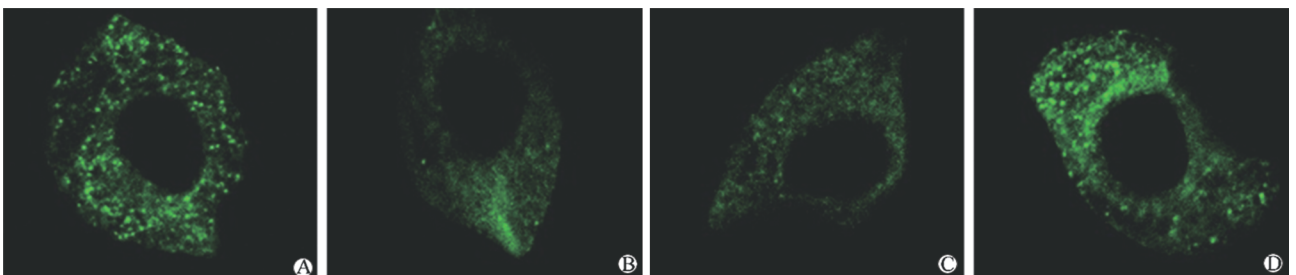


图 4 HF+HP 治疗过程中 SAP 患者血清诱导的 HUVECs p-RhoA 分布的变化

Fig 4 Distribution changes of p-RhoA in HUVECs treated with the sera of SAP patients before and at different time points after HF+HP treatment

HF+HP: Hemofiltration with hemoperfusion; SAP: Severe acute pancreatitis; HUVECs: Human umbilical vein endothelial cells. A: Control; B: Pre-HF+HP; C: 6 h-HF+HP; D: 20 h-HF+HP. Original magnification: ×2 000

2.5 HF+HP 治疗对内皮细胞 p-RhoA 分布的影响 为了研究 HF+HP 治疗过程中 p-RhoA 分布的变化,我们用免疫荧光显微镜观察了 HF+HP 治疗不同时间点 SAP 合并 ARDS 患者血清诱导的 HU-VECs 中 p-RhoA 蛋白的细胞分布。结果(图 4)显示,正常对照组 p-RhoA 主要分布在细胞胞质; HF+HP 组治疗前 p-RhoA 胞质染色减弱, HF+HP 治疗 6 h 和 20 h 时 p-RhoA 染色有所增强,各组变化趋势与蛋白质印迹分析结果一致。

### 3 讨论

SAP 由于胰腺坏死引起体内大量炎症介质释放, 30%~60% 的患者在早期即可发生 ALI 甚至 ARDS、急性肾功能衰竭等严重并发症<sup>[8]</sup>, 其中呼吸系统并发症最为多见, 患者常常有不同程度的呼吸功能不全表现<sup>[9]</sup>。尽管常规使用生长抑素、质子泵抑制剂、抗生素, 以及机械通气等综合手段进行治疗, 但是一旦出现 MODS, SAP 的病死率仍高达 50% 以上<sup>[10]</sup>。

TNF- $\alpha$  是炎症反应过程中出现最早、最重要的炎症介质,在 SAP 的全身炎症反应中起轴心作用,它能激活中性粒细胞释放超氧化基团和弹性蛋白酶,增加白细胞膜表达黏附因子、诱导血管内皮细胞通透性增加、刺激其他细胞因子如白介素(IL)等的合成与释放<sup>[11-12]</sup>。近年研究发现,TNF- $\alpha$  可通过上调肺细胞间黏附分子 1(ICAM 1)/血管细胞黏附分子 1(VCAM 1),使中性粒细胞聚集在肺组织,引起肺部炎症和氧化应激反应;TNF- $\alpha$  与氧化应激相互协作,形成恶性循环,放大炎症反应并加重肺组织损伤<sup>[13]</sup>。此外,在 ARDS 患者的血清、支气管肺泡灌洗液、肺间质水肿液中均能检测到 TNF- $\alpha$ <sup>[14]</sup>。本研究也发现 SAP 继发 ALI/ARDS 患者较未出现肺损伤的 SAP 患者血循环中存在更高水平的 TNF- $\alpha$ ,且肺功能损伤越重,血清 TNF- $\alpha$  水平越高,证实 TNF- $\alpha$  在 SAP 患者并发 ALI/ARDS 中发挥重要作用,并且提示 SAP 患者血清中 TNF- $\alpha$  的水平可以早期预示其肺部损伤的严重程度。

血液净化治疗是近年来应用于临床抢救 SAP 患者的一种新的辅助治疗手段<sup>[15]</sup>。研究认为 CBP 可以非特异性地清除全身炎症反应综合征(SIRS)患者体内产生过多的抗炎介质和促炎介质<sup>[16-17]</sup>。由于血液滤过的滤器可以对流清除和吸附 TNF- $\alpha$ ,同时活性树脂灌流器也可以充分吸附炎症介质<sup>[18]</sup>,因此本研究中我们将连续性血液滤过和灌流串联使用(HF+HP)治疗 SAP 继发 ARDS 患者 20~24 h,期望能通过对流和吸附的方式更有效地清除患者血循环中的 TNF- $\alpha$ 。结果我们发现治疗 6 h 后患者血清中炎症因子 TNF- $\alpha$  明显下降,至治疗 20 h 时下降最为明显,同时治疗后患者的呼吸功能得到一定改善,提示 HF+HP 治疗可能通过有效地清除 TNF- $\alpha$ ,至少部分改善了 SAP 继发 ARDS 患者的呼吸功能。

肺微血管内皮通透性增加可使肺泡内大量的蛋白及水分积聚,导致肺水肿和肺泡透明膜形成,引起患者氧合障碍,临床上患者常常表现为顽固性低氧血症和呼吸窘迫,这是 ALI/ARDS 最典型的特征<sup>[1,3]</sup>。最近,Mong 等<sup>[19]</sup>研究发现,在人类肺微血管内皮细胞中 TNF- $\alpha$  可激活 RhoA 和通过 RhoA 激酶途径介导内皮细胞的 F-actin 重组、紧密连接(TJ)蛋白重分布和内皮通透性增加。我们在既往的

研究中也发现用 SAP 患者血清刺激 HUVECs 可使细胞内活化形式的 GTP-RhoA 表达明显增加,F-actin 发生重构,血管内皮通透性增加;而用 CBP 治疗后的 SAP 患者血清刺激 HUVECs 可使细胞内活化的 GTP-RhoA 表达减少,且 F-actin 重构及内皮高通透性减轻<sup>[7]</sup>。

基于本研究发现 HF+HP 治疗可以有效清除 TNF- $\alpha$  这一事实,我们进一步验证 HF+HP 治疗是否通过有效清除 TNF- $\alpha$  减少了 RhoA 的活化,从而降低血管内皮通透性。RhoA 活性受其磷酸化修饰的调节,RhoA 的丝氨酸 188 位磷酸化可增强 GDP-RhoA 与鸟嘌呤核苷酸解离抑制蛋白 GDI(一种对 RhoA 活性起负调节作用的蛋白质)的相互作用,使 RhoA 蛋白被局限在胞质内,从而减少 RhoA 蛋白被招募至细胞膜转变为有活性形式的 GTP-RhoA<sup>[20-21]</sup>。我们通过蛋白质印迹分析和共聚焦显微镜观察发现,SAP 合并 ARDS 患者的血清和 TNF- $\alpha$  单独刺激一样可以减少 HUVECs 中 RhoA 的磷酸化修饰;HF+HP 治疗 6 h 后可增加内皮细胞中的 RhoA 磷酸化修饰,至治疗 20 h 这一效应最为明显,这与患者 HF+HP 治疗后血清 TNF- $\alpha$  变化趋势和患者氧合能力的改善情况相一致,表明 HF+HP 治疗改善 SAP 合并肺损伤患者的氧合能力,与其有效清除 TNF- $\alpha$  并增加 RhoA 的磷酸化修饰来保护内皮细胞功能有关。因此,对合并肺损伤的 SAP 患者,积极早期进行 HF+HP 治疗,对于改善预后可能具有重要意义。

综上所述,HF+HP 治疗 SAP 合并 ALI/ARDS 患者可能通过有效清除 TNF- $\alpha$  和增加内皮细胞 p-RhoA 的水平,从而抑制 RhoA 的活化,减少内皮细胞通透性,这可能是 HF+HP 改善 SAP 合并 ALI/ARDS 患者肺功能的重要机制。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Browne G W, Pitchumoni C S. Pathophysiology of pulmonary complications of acute pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12: 7087-7096.
- [2] Akbarshahi H, Rosendahl A H, Westergren-Thorsson

- G, Andersson R. Acute lung injury in acute pancreatitis: awaiting the big leap[J]. *Respir Med*, 2012, 106: 1199-1210.
- [3] Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome[J]. *J Pathol*, 2004, 202: 145-156.
- [4] Panek J, Karcz D, Pieton R, Zasada J, Tusinski M, Dolecki M, et al. Blood serum levels of proinflammatory cytokines in patients with different degrees of biliary pancreatitis[J]. *Can J Gastroenterol*, 2006, 20: 645-648.
- [5] Honore P M, Joannes-Boyau O, Boer W, Collin V. High-volume hemofiltration in sepsis and SIRS: current concepts and future prospects [J]. *Blood Purif*, 2009, 28: 1-11.
- [6] Honor P M, Jacobs R, Boer W, Joannes-Boyau O, De Regt J, De Waele E, et al. New insights regarding rationale, therapeutic target and dose of hemofiltration and hybrid therapies in septic acute kidney injury[J]. *Blood Purif*, 2012, 33(1-3): 44-51.
- [7] Du X G, Chen X M, Gan H, Li Z R, Wen Y J, Wang X C. Continuous blood purification ameliorates RhoA-mediated endothelial permeability in severe acute pancreatitis patients with lung injury[J]. *Int J Artif Organs*, 2011, 34: 348-356.
- [8] Beger H G, Rau B M. Severe acute pancreatitis: clinical course and management [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13: 5043-5051.
- [8] Bumbasirevic V, Radenkovic D, Jankovic Z, Karamarkovic A, Jovanovic B, Milic N, et al. Severe acute pancreatitis: overall and early versus late mortality in intensive care units[J]. *Pancreas*, 2009, 38: 122-125.
- [10] Malangoni M A, Martin A S. Outcome of severe acute pancreatitis[J]. *Am J Surg*, 2005, 189: 273-277.
- [11] Malleo G, Mazzon E, Siriwardena A K, Cuzzocrea S. Role of tumor necrosis factor-alpha in acute pancreatitis: from biological basis to clinical evidence [J]. *Shock*, 2007, 28: 130-140.
- [12] Li T, Luo N, Du L, Zhou J, Zhang J, Gong L, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  plays an initiating role in extracorporeal circulation-induced acute lung injury[J]. *Lung*, 2013, 191: 207-214.
- [13] Kim C W, Lee T H, Park K H, Choi S Y, Kim J. Human lactoferrin suppresses TNF- $\alpha$ -induced intercellular adhesion molecule-1 expression via competition with NF- $\kappa$ B in endothelial cells[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586: 229-234.
- [14] Park W Y, Goodman R B, Steinberg K P, Ruzinski J T, Radella F 2nd, Park D R, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164 (10 Pt 1): 1896-1903.
- [15] Mao H J, Yu S, Yu X B, Zhang B, Zhang L, Xu X R, et al. Effects of coupled plasma filtration adsorption on immune function of patients with multiple organ dysfunction syndrome[J]. *Int J Artif Organs*, 2009, 32: 31-38.
- [16] Huang Z, Wang S R, Su W, Liu J Y. Removal of humoral mediators and the effect on the survival of septic patients by hemoperfusion with neutral microporous resin column[J]. *Ther Apher Dial*, 2010, 14: 596-602.
- [17] Bammens B, Evenepoel P, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Removal of the protein-bound solute p-cresol by convective transport: a randomized crossover study [J]. *Am J Kidney Dis*, 2004, 44: 278-285.
- [18] Mandolfo S, Borlandelli S, Imbasciati E. Leptin and beta2-microglobulin kinetics with three different dialysis modalities[J]. *Int J Artif Organs*, 2006, 29: 949-955.
- [19] Mong P Y, Petrulio C, Kaufman H L, Wang Q. Activation of Rho kinase by TNF-alpha is required for JNK activation in human pulmonary microvascular endothelial cells[J]. *J Immunol*, 2008, 180: 550-558.
- [20] Tamma G, Klussmann E, Procino G, Svelto M, Rosenthal W, Valenti G. cAMP-induced AQP2 translocation is associated with RhoA inhibition through RhoA phosphorylation and interaction with RhoGDI [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 8): 1519-1525.
- [21] Rolli-Derkinderen M, Sauzeau V, Boyer L, Lemichez E, Baron C, Henrion D, et al. Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells[J]. *Circ Res*, 2005, 96: 1152-1160.