分类号 R363.2 密 级 学校代码 1 0 3 6 7

U D C 610 编 号 学 号 20127831231

4-苯基丁酸对脓毒症大鼠肺血管渗漏的作用及

机制

Effect and mechanism of 4-phenylbutyric acid on vascular permeability of pulmonary in sepsis

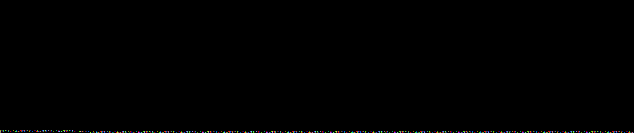
rat

**论文类别：科学学位型**

**作 者 姓 名 宋仁杰 指导教师姓名 付贵峰主任医师 申请学位级别 硕 士 学位授予单位 蚌埠医学院 学 科 专 业 急诊医学 研 究 方 向 重症医学 论文答辩时间 2015 年 5 月 学位授予日期 2015 年 6 月**

**答辩委员会主席： 论 文 评 阅 人：**

**2015 年 5 月**



**硕 士 学 位 论 文**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **论** | **文** | **题** | **目：** | 4-苯基丁酸对脓毒症大鼠肺血管渗漏的作用及 |
|  |  |  |  | 机制 |
|  |  |  |  | Effect and mechanism of 4-phenylbutyric acid on |
| **研** | **究 生 姓** | | **名:** | vascular permeability of pulmonary in sepsis rat.  **宋仁杰** |
| **指** | **导** | **教** | **师 :** | **付贵峰主任医师** |
| **学** | **科** | **专** | **业 :** | **急诊医学** |
| **研** | **究** | **方** | **向 :** | **重症医学** |

**论 文 工 作 时 间 : 2013 年 1 月至 2014 年 3 月**

学 位 论 文 原 创 性 声 明

本人郑重声明：本人所呈交的学位论文是本人在导师指导下独立进行实验研究工作所取得的成果，本论文中不包含其他人已经发表或已经获取得的研究成果。在本论文撰写中所引用其他研究者的研究内容和成果时已在论文中给予特别标注和明确说明。对本论文的实验研究以及论文撰写过程中给予帮助和建议等贡献的其他人士，也已作了致谢说明。

本人完全理解本声明的法律责任，以及所涉及的结果将由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

关于学位论文著作权的共享声明

根据《中华人民共和国著作权法》和《高等院校知识产权管理条例》，本学位论文，题目：4-苯基丁酸对脓毒症大鼠肺血管渗漏的作用及机制，是研究生在导师指导下完成的职务作品，得到蚌埠医学院相关部门科室的物质技术和经费支持，因此，本学位论文的著作权由研究生，导师和蚌埠医学院三方共同享有，均享有署名权和使用权等权益；本学位论文成果归属蚌埠医学院。

根据国家学位授予条例，学校对本学位论文有使用权，包括保存本学位论文； 因教学和科研的目的，保留在图书馆被查阅或借阅；学校可根据国家规定将本学位论文送交国家有部门保留和使用。学校在公布本学位论文的全部或部分内容时，应保障研究生和导师的署名权等权益。研究生和导师在公开发表本学位论文的全部或部分内容时必须保障学校的署名权等权益，即在发表论文时蚌埠医学院及相关部门科室应署名为作者单位。

声明人完全理解本声明的法律责任。

研究生签名： 导师签名： 日期： 年 月 日

目 录

[摘 要](#_Toc686345817) 4

[结论：](#_Toc686345818) 4

[1. Sepsis can stimulate endoplasmic reticulum stress in vascular endothelial cells. ERS to attend the process of vascular permeability increasing. Protein GRP78 、](#_Toc686345819) 4

[2. Endoplasmic reticulum stress may adjust the vascular permeability via regulation of theformation of stress fiber .](#_Toc686345820) 4

[3. 4-PBA may restrain the formation of stress fiber and depress the vascular permeability via inhibiting endoplasmic reticulum stress.](#_Toc686345821) 4

**[1.](#_Toc686345822)** [引 言](#_Toc686345822) 4

[2. 材料与方法](#_Toc686345823) 5

[3、](#_Toc686345824)[结果](#_Toc686345824) 10

[4、 讨论](#_Toc686345825) 13

[参考文献](#_Toc686345826) 15

[附录](#_Toc686345827) **[A](#_Toc686345827)** 17

[附录](#_Toc686345828) **[B](#_Toc686345828)** 18

[参考文献](#_Toc686345829) 19

**4-苯基丁酸对脓毒症大鼠肺血管渗漏的作用及机制**

摘 要

**目的：**探讨4-苯基丁酸（4-phenylbutyric acid, 4-PBA）对脓毒症大鼠肺血管渗漏的作用及机制。

**方法：**采用盲肠结扎穿孔术（CLP）建造脓毒症大鼠模型，观察给予4-PBA后大鼠的肺血管通透性、内质网应激标志蛋白如葡萄糖调节蛋白78(glucose regul ated protein78, GRP78)、葡萄糖调节蛋白94（glucose regulated protein94, GRP

94）与CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白（CCAAT/enhancer binding protein ho mologous protein, CHOP）表达的变化。培养大鼠肺静脉内皮细胞，观察给予脂多糖（Lipopolysaccharide, LPS）和4-PBA预处理加脂多糖对细胞应力纤维（F- actin）的影响。

**结果：**与假手术组比较，脓毒症大鼠肺血管通透性显著升高，内质网应激标志蛋白（GRP78、GRP94、CHOP）的表达增高。4-PBA预处理后，脓毒症大鼠肺血管的通透性下降，内质网应激标志蛋白表达下降。与正常肺静脉内皮细胞比较，LPS组肺静脉内皮细胞应力纤维增多，细胞呈收缩状态。而4-PBA预处理组肺静脉内皮细胞形态则近似正常。

结论：

1.脓毒症可诱发血管内皮细胞产生内质网应激。内质网应激介入了脓毒症血管通透性上升的过程，内质网应激分子GRP78、GRP94和CHOP蛋白是参与脓毒症血管通透性上升的重要分子。

2.内质网应激大概经由调节血管内皮细胞应力纤维形成继而调节血管通透性。

3.4-PBA可能通过抑制内质网应激，抑制内皮细胞应力纤维形成从而降低血管通透性。

**关键词 ：**4-苯基丁酸； 脓毒症； 血管渗漏； 内质网应激

**Effect and mechanism of 4-phenylbutyric acid on vascular permeability of pulmonary in sepsis rat**

**Abstact**

**Objective:** To approsch the effect and mechanism of 4-phenylbutyric acid on vascular permeability of pulmonary in sepsis rat.

**Methods:** With cecal ligation and puncture (CLP) imitated sepsis model, we observed

The variability of the pulmonary vascular permability, endoplasmic reticulum stress marker ptroteins such as GRP78, GRP94 and CHOP of sepsis rat model after applied 4-phenylbutyric. With culturing pulmonary vein endothelial cells, we observed the effect of F-actin after giving LPS or 4-PBA .

**Results:** In comparison with the sham group, sepsis raised the pulmonary

Vascularpermability and the expression of the endoplasmic reticulum stress marker ptroteins, but 4-phenylbutyric acid was exhibit the opposed effect. In comparison with the sham group, Lipopolysaccharide increased the expression of F-actin which induced cell constraction. 4-phenylbutyric acid was amendmented this phenomenon. **Conclusion：**

# 1. Sepsis can stimulate endoplasmic reticulum stress in vascular endothelial cells. ERS to attend the process of vascular permeability increasing. Protein GRP78 、

GRP94 and CHOP are the important molecules in the process of vascular permeability increasing after Sepsis.

# 2. Endoplasmic reticulum stress may adjust the vascular permeability via regulation of the formation of stress fiber .

# 3. 4-PBA may restrain the formation of stress fiber and depress the vascular permeability via inhibiting endoplasmic reticulum stress.

**Keywords:** 4-phenylbutyric; acid; Sepsis; Vascular; permeability Endoplasmic reticulum stress.

**4-苯基丁酸对脓毒症大鼠肺血管渗漏的作用及机制**

# **1.** 引 言

脓毒症是感染导致的周身炎症反应综合征（SIRS）,证明有细菌或非常可疑的感染灶的存在。当今认为脓毒症为感染引起的临床综合征，发生率和病死率都很高。据不完全统计，全球每年有2千多万人罹患脓毒症，每天约14,00人死于脓毒症，是危重症医学面临的一大难题[1]。

现今认为在脓毒症病理生理的过程中存在着微循环的功能障碍，主要显示为微循环的通透性和血流量的变化。微循环通透性增高将导致组织水肿和多脏器功能衰竭[14]。脓毒症微循环的改变现已被观测到，如血管密度的减少及血液供给的改变，这些现象可能是因为自我调节机制的失常，如某些区域诱导型一氧化氮合酶表达的减少导致血管不能维持正常的血液灌注，还可能引起内皮损伤、皮下胶原暴露和微血栓的形成[15]。

目前研究显示脓毒症致血管渗漏主要发生在微静脉，少见于毛细血管。现认为血管内皮细胞在微静脉通透性增高过程中发挥重要作用。大分子物质穿透微静脉主要经由细胞旁途径和穿细胞途径两种方法[17]。多种细胞因子、炎性介质、蛋白酶、P物质等都可以观测到出现内皮间裂隙。大分子物质还可以通过囊泡-空泡细胞器VVOs直接穿过内皮细胞。VVOs是一串由内皮胞膜内化形成的小泡，由3层单位膜构成，彼此之间和内皮胞膜之间有小孔连接，中间可存在隔膜。研究表明大分子的示踪物质可以经由VVOs快速渗透到微静脉血管外[18]。

目前研究显示脓毒症致血管渗漏主要有三方面的原因，毛细血管内皮细胞间的通透性增强，血管内皮凋亡的增加和细胞被膜的破坏[17]。已有研究显示多种机制参与调节血管通透性，Rho激酶作为RhoA的下游分子通过抑制肌球蛋白轻链磷酸酶MLCP提高肌球蛋白轻链MLC的磷酸化水平，从而通过促进应力纤维的形成来调控血管内皮的通透性[23]。升高的胞内钙离子可以联接钙调蛋白构成钙-钙调蛋白复合物，激活依赖钙-钙调蛋白复合物的肌球蛋白轻链激酶(MLCK)，同样能够经由调节肌球蛋白轻链磷酸化水平来调理内皮细胞的通透性[25]。

内质网是真核细胞胞内一种非常重要的细胞器，其对细胞内部环境和外部环境的变动是极其敏感的。缺血损伤、氧化应激、钙稳态紊乱均可引起其功能紊乱，当打破了蛋白质合成、成熟和降解之间的平衡，呈现内质网腔内错误折叠或未折

叠蛋白的聚集及钙离子紊乱的状态，称为内质网应激。内质网应激（ERS）为细胞在种种刺激因素作用下的一种适应性过程，过强或过长时间的内质网应激会致使细胞凋亡。当内质网腔积聚着过多的错误折叠或未折叠蛋白时会推动细胞产生一种适应性反应，叫做未折叠蛋白反应（UPR）[29]。未折叠蛋白反应首先表现为蛋白合成的停歇，随后应激反应蛋白的基因表达，会改善细胞生理状况，但如果刺激强度超过细胞承受能力时，会诱发内质网独特的内质网相关凋亡通路来消除受损严重以致难以修复的细胞[30]。

已知ERS参与多种疾病的病理生理过程如动脉粥样硬化、糖尿病、帕金森病和肿瘤等。Okada等研究主动脉缩窄致大鼠心力衰竭模型中发现该模型存在持续的内质网应激，并且CHOP途径受到激活[44]。在心肌梗死致心力衰竭模型中同样发现持续的内质网应激，并且认为JNK、CHOP和caspase-12都参与了心肌细胞的凋亡[45]。内质网应激的PERK-eIF2α磷酸化通路调控着胰岛素合成和释放。研究提示Akita鼠因为错误折叠胰岛素的堆积触发了内质网应激并促进了

Akita鼠发生糖尿病，而裂解CHOP基因或敲除Ins2基因能够明显降低血糖的升高。提示持续的内质网应激可能通过诱发β细胞的凋亡来促进糖尿病的发生[47, 48]。

Schidberg等研究显示LPS刺激人脐静脉内皮细胞导致内质网超微结构严重损伤和内皮细胞凋亡。许多研究表明，脓毒症血管内皮细胞存在着内质网应激，而且内质网应激诱发的细胞功能障碍甚至凋亡是脓毒症多脏器功能障碍的细胞学基础[54, 55]。

4-苯基丁酸（4-PBA）是拥有分子伴侣活性的短链脂肪酸，能够通过稳定蛋白质的构象，改善内质网折叠能力从而减轻ERS造成的损伤。有研究显示4-PBA可减轻ERS对胰岛β细胞的损伤，保护胰岛β细胞功能，从而延缓2型糖尿病的发展。也有研究认为4-PBA可通过抗氧化应激和促进心肌NO的生成对糖尿病大鼠发挥心脏保护作用[56-58]。然而4-PBA对脓毒症大鼠血管渗漏是不是同样具有保护作用尚不清楚，因此本次实验采纳盲肠结扎穿孔术（CLP）建造脓毒症的大鼠模型，观察4-PBA对脓毒症大鼠血管渗漏的作用并初步探讨其作用机制。

# 2. 材料与方法

## 2.1 主要药品和仪器

### 2.1.1 主要仪器设备

#### 2.1.1.1 组织匀浆机 T18，IKA

#### 2.1.1.2 激光共聚焦显微镜 HITACHI

#### 2.1.1.3 pH 计 (720A 型) Orion，美国

#### 2.1.1.4 超净工作台 北京净化设备厂，中国

#### 2.1.1.5 CO2 培养箱 SHEL/JB，美国

#### 2.1.1.6 倒置显微镜 (CK 40) Olympus，日本

#### 2.1.1.7 高速冷冻离心机(先锋30) 贝克曼，美国

#### 2.1.1.8 超低温冰箱 Sanyo，日本

#### 2.1.1.9 多功能读板机 生物-tedsynergy HT，美国

#### 2.1.1.10 NC 膜 Millipore，美国

#### 2.1.1.11 垂直板状电泳仪 Bio-Rad，美国

#### 2.1.1.12 多功能闪烁计数仪 Beckman，美国

#### 2.1.1.13 电子天平(1g/10 万) Sartorius，德国

#### 2.1.1.14 荧光分光光度仪 贝克曼，美国

#### 2.1.1.15 Sha-b 恒温振荡仪 江苏金坛中大仪器厂，中国

#### 2.1.1.16 恒温水浴箱 余姚市肖东仪器厂，中国

#### 2.1.1.17 微型动静脉导管 自制

#### 2.1.1.18 水银血压计 自制

#### 2.1.1.19 电泳仪 Hofer，美国

### 2.1.2 药品及试剂

#### 2.1.1.1 4-苯基丁酸 Sigma，美国

#### 2.1.1.2 兔抗鼠 Grp78 抗体 Abcom，美国

#### 2.1.1.3 鼠抗鼠 Chop 抗体 Abcom，美国

#### 2.1.1.4 甘油 Amresco，美国

#### 2.1.1.5 Tris Pierce，美国

#### 2.1.1.6 兔抗鼠 Grp94 抗体 Abcom，美国

#### 2.1.1.7 十二烷基硫酸钠 Promega，美国

#### 2.1.1.8 二硫苏糖醇 (DTT) Sigma，美国

#### 2.1.1.9 β-巯基乙醇 Sigma，美国

#### 2.1.1.10 Triton X-100 Sangon，美国

#### 2.1.1.11 鬼笔环肽 Molecular probe，美国

#### 2.1.1.12 TEMED Sigma，美国

#### 2.1.1.13 Fura-3/AM 北京中ft生物技术有限公司

#### 2.1.1.14 戊巴比妥钠 Sigma，美国

#### 2.1.1.15 PI Sigma，美国

#### 2.1.1.16 发光增强试剂盒 皮尔斯，美国

#### 2.1.1.17 其余试剂为国产分析纯

## 2.2 主要试剂配制

### 2.2.1 实验主要药品及溶液配制

#### 2.2.1.1 复方氯化钠溶液：氯化钠145 mmol/L、氯化钾4 mmol/L、CaCl2·2H2O 2.2

mmol/L。

#### 2.2.1.2 3%戊巴比妥钠溶液：量取戊巴比妥钠3g，溶解于100 ml生理盐水中，室温保存，使用时按1ml/kg体重于腹腔注射。

#### 2.2.1.3 800U/ml肝素钠：取1支肝素钠(12500U/2ml)，容积于14ml生理盐水中，室温保存，使用时按1 ml/kg体重经插管动脉注射。

#### 2.2.1.4 4-苯基丁酸溶液：美国Sigma公司。取1瓶4-苯基丁酸(5mg)，溶解于5ml磷酸缓冲液中，浓度为1mg/ml，4℃冰箱中保存备用，临用时用磷酸缓冲液稀释至0.1mg/ml。

#### 2.2.1.5 鬼笔环肽溶液：鬼笔环肽0.1mg溶解于1ml无水甲醇配成贮存液，能够在-20度且避光的情况下长时间储存，工作液的浓度为5ug/ml。

#### 2.2.1.6 PBS溶液(磷酸缓冲液)：将商品化的PBS小袋倒入量杯中，加入蒸馏水至

2000ml。如果需要，可以将pH滴定所需的范围内，4℃冰箱中储存。

#### 2.2.1.7 0.1%Triton-X 100溶液：0.4g枸橼酸，3.0g柠檬酸三钠，加入蒸馏水直至1000ml。即为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(枸橼酸又称柠檬酸)，再用这个原液稀释成0.1%的TritonX-100。

#### 2.2.1.8 4%多聚甲醛：2g多聚甲醛加至45ml蒸馏水中，加4ml 10N的NaOH，加温至65℃。直至完全溶解后(一般不超过30分钟)，再加入5ml的PBS，将pH滴定至7.4，用0.2mm孔径的滤膜过滤将未溶的颗粒过滤掉。注：4℃可保存2周。

### 2.2.2 GRP78、GRP94及CHOP等蛋白免疫印迹实验时的溶液配制

#### 2.2.2.1 配制8%下层胶的方法如下。

名 称 取样

Tris8.8 2.5 ml

10%SDS 100 ml

30%甲叉双丙烯酰胺 2.7 ml

10%APs 50μl

TEMED 20μl

DdH2O 4.6 ml

#### 2.2.2.2 配制3%上层胶的方法如下。

名 称 取样

Tris6.8 0.125 ml

10%SDS 0.05 ml

30%甲叉双丙烯酰胺 0.53 ml

10%APs 50μl

TEMED 10μl

DdH2O 3.7 ml

#### 2.2.2.3 30%甲叉双丙烯酰胺

丙烯酰胺 40 g

N，N'-亚甲双丙烯酰胺 2.0 g

ddH2O 加至 100 mL

4℃避光保存。

#### 2.2.2.4 Tris-甘氨酸浓缩液(10×)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Tris base | 200 mmol/L | 2.422 g |
| 甘氨酸 | 230 mmol/L | 1.726 g |
| ddH2O |  | 加至 100 mL |

pH值8.6 4℃保存。

#### 2.2.2.5 10%过硫酸铵

APs 10% (w/v) 0.1 g

ddH2O 加至10 mL

现配现用。

#### 2.2.2.6 上样buffer（5×）（10ml):

Tris-HCl 0.6ml

甘油2.5ml

SDS 0.2g

溴酚兰0.008g

β-巯基乙醇0.5ml

PH调至6.8.

#### 2.2.2.7 提取蛋白的裂解液（100ml）：10ml分装，临用前每10ml加入蛋白酶片 1

片，β-巯基乙醇10ul。

Tris 0.61g

氯化钠 0.88g

氟化钠0.042g

EDTA 0.0584g

EGTA 0.038g

DdH2O 2.44 mL

Na3ro4 0.0184g

Tritonx-100 1ml

#### 2.2.2.8 电泳缓冲液（5×）（1000ml)：

Tris base 0.125 mmol/L 15.1g

甘氨酸1.25 mmol/L 94 g SDS 5g

ddH2O加至1000 mL

pH值8.6

#### 2.2.2.9 电转膜转移缓冲液

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Tris base | 25 mmol/L | 3.033 g |
| 甘氨酸 | 192 mmol/L | 14.417 g |
| 甲醇 | 20% (v/v) | 200 mL |
| ddH2O |  | 加至 1000 mL |
| pH 值 8.3~8.4 |  |  |
| 2.2.2.10 TBS 液 (10×) |  |  |
| Tris-base | 500 mmol/L | 24.23 g |
| NaCl | 1500 mmol/L | 87.66 g |
| ddH2O  pH 值 7.4 |  | 加至 1000 mL |

室温下储存，临用时用双蒸水稀释10倍。

#### 2.2.2.11 5%封闭液

脱脂奶粉5% (w/v) 1 g

TBS液加至20 mL

## 2.3 主要方法

实验一脓毒症大鼠肺血管通透性改变

1.动物及分组

成年SD大鼠24只，雌雄不限，体重在220g左右，由第三军医大学大坪医院野战外科研究所的动物中心提供。应用随机数字表完全随机分为3组，每组8只，分别为假手术组，CLP组，4-PBA+CLP组。

2.脓毒性休克大鼠模型制备

采用盲肠结扎穿孔术（CLP）建造脓毒性休克大鼠模型：实验前12个小时禁食、自由饮水。第二天用3%戊巴比妥钠常规腹腔麻醉(1.5ml/kg)，让其仰卧，四肢固定，常规腹部用碘酒消毒，剪开大鼠腹腔，找出盲肠，把盲肠远端结扎，在盲肠末端用锥形器造瘘，术后缝合伤口，消毒；在股动脉处插入导管，打入肝素钠(800U/kg)用以全身抗凝，动脉导管连接三通器后接自制血压计监测大鼠的血压。平均动脉压(MAP)较基础值下降了30%便可认为脓毒性休克大鼠模型建立成功。

3.肺组织提取

在大鼠颈部给予上腔静脉插管，从中注入荧光素(1%异硫氰酸荧光素标记牛血清白蛋白)，2小时后打开大鼠的胸腹腔，剪断大鼠的下腔静脉，同时从上腔静脉插管内注入生理盐水进行肺灌洗，待肺脏洗白后处死大鼠，剪取一侧肺组织，用滤纸吸干肺脏表面水分，称重，记录重量（g），剪碎碾磨后倒入10ml离心管，同时加入等量的磷酸缓冲液。

4.指标测定

肺组织中异硫氰酸标记的白蛋白的通透性（检测漏出至血管外的荧光白蛋白的OD值）（指标测定方法置后）。

实验二内质网应激分子GRP78、GRP94和CHOP蛋白在脓毒症大鼠模型中的表达变化

1.动物及分组：

成年SD大鼠24只，雌雄不限，体重在220g左右，由第三军医大学大坪医院野战外科研究所的动物中心提供。应用随机数字表完全随机法分为3组，每组

8只，分别为假手术组，CLP组，4-PBA+CLP组。

2.血管标本获取及制备：

制模成功后打开大鼠腹腔，分离出肠系膜静脉，剪取后放入1.5mlEP管中存入-70℃冰箱备用。

3. 指标测定

免疫印迹检测脓毒症大鼠血管中的内质网应激标志蛋白的表达变化（指标测定方法置后）。

实验三脓毒症大鼠肺血管内皮细胞F-actin表达及分布

1.动物及分组

于实验前一天将培养的肺静脉内皮细胞消化接种于激光共聚焦培养皿中，实验当天将实验分为3组，分别为正常对照组，LPS组，4-PBA+LPS组。LPS组为加入LPS(100ug/ml)，4-PBA+LPS组为预先加入4-PBA(10mmol/ml)，4小时后再加入LPS（100ug/ml）。

2. 血管标本制备

将正常大鼠常规麻醉固定后打开胸腔，分离剪取大鼠肺静脉，在无菌操作台洗涤后剪碎，接种于细胞培养瓶中，加入4ml细胞培养液。3天后去除组织块，

2-3天更换培养液，待细胞长满培养瓶后即可消化传代。

3. 指标测定

应用激光共聚焦显微镜来观察各组肺静脉内皮细胞内的应力纤维形态及细胞形态的变化（指标测定方法置后）。

指标测定方法

1.肺血管荧光物质渗透性测量

在大鼠颈部给予上腔静脉插管，从中注入荧光素(1%异硫氰酸荧光素标记牛血清白蛋白)，2小时后打开大鼠的胸腹腔，剪断大鼠的下腔静脉，同时从上腔静脉插管内注入生理盐水进行肺灌洗，待肺脏洗白后处死大鼠，剪取一侧肺组织，用滤纸吸干肺脏表面水分，称重，记录重量（g），剪碎碾磨后倒入10ml离心管，同时加入等量的磷酸缓冲液。在匀浆机中匀浆，将匀好的组织放入离心机中离心，

6000转/分，离心10min。最后取上清液用分光光度计测定其OD值。

2. F-actin形态及分布测定

将消化获取的血管内皮细胞用4%多聚甲醛在37℃的条件下孵育30min, 磷酸缓冲液漂洗3次，每次5min。再用0.1%TritonX-100 在室温下孵育15min, 磷酸缓冲液漂洗3次，每次5min。最后用5μg/ml的鬼笔环肽37℃避光孵育30min，磷酸缓冲液漂洗3次，每次5min.50%的缓冲甘油封片后用激光共聚焦显微镜观察胞内Factin的形态、分布变化和细胞的形态。

3. GRP78、GRP94和CHOP蛋白表达测定

(1)蛋白提取

拿出在-70℃冰箱中冻存的血管样本，用滤纸吸干，冰上剪碎。放入1.5ml匀浆器中并加入200-300ul的裂解液，放置裂解50min到1h。再吸入1.5ml的EP管中离心条件为4℃，10000g，10-15min。然后吸取上清，加入buffer待用。

(2)免疫印迹(Western blot)

①电泳胶配制

根据文献，配制8%下层较，配制方法如下。

名 称 取样

Tris8.8 2.5 ml

10%SDS 100 ml

30%甲叉双丙烯酰胺2.7 ml

10%APs 50μl

TEMED 20μl

DdH2O 4.6 ml

配制3%上层较，配制方法如下。

名称取样

Tris6.8 0.125 ml

10%SDS 0.05 ml

30%甲叉双丙烯酰胺0.53 ml

10%APs 50μl

TEMED 10μl

DdH2O 3.7 ml

②加样电泳

a加入电泳缓冲液直至液面高出内侧玻璃板上缘约0.4 cm。

b用微量加样器吸取待测蛋白样品液30μl加入每个加样孔中。

c给予80 V电压电泳至蛋白跑至下层胶。

d蛋白跑至下层胶时，换用100-120 V电压继续电泳，直至溴酚蓝跑出胶底部，停止电泳。

e卸下电泳胶板，用刮勺撬开预制胶，按Marker切取相应的胶块。

③转膜

a按滤纸、膜、凝胶、滤纸的顺序组装成转移单位。

b将固定好的转移单位放入加入冰盒的电转仪中，倒入电转液，在4℃条件下22V电转1.5h。

c停止转移，取出纤维素膜。

④封闭

把纤维素膜放入塑料盘中，倒入封闭液（5%脱脂奶粉）至完全倾没膜，将塑料盘平放在摇床上室温孵育2h。

⑤一抗结合

a将膜夹入剪切好的塑料袋中，封闭好袋的三边，后加入适量的抗相应内质网应激标志蛋白的抗体。

b把塑料袋密封好，将其平放在4℃冰箱中的摇床平台上，过夜；

c弃去一抗，用TBS漂洗膜3次，每次5 min。

⑥二抗结合

a将膜放入塑料盘中，加入二抗稀释液（辣根过氧化物酶标记的IgG），室温下孵育1h。

b用TBS漂洗膜15 min，重复4次。

⑦胶片成像，化学发光法

将膜放入塑料盘中，加入发光试剂，A液和B液以1: 1比例混合，置于摇床上6 分钟，随后在暗室中用X胶片感光、显影及定影。

## 2.4 数据处理及统计学分析

所有数据均以均数±标准差( *x**s*)表示，组间采用单因素或双因素方差分析。*P*<0.05为相差显著；*P*<0.01为相差非常显著。用SPSS 10.0统计分析软件进行数据处理。

# 3、结果

实验一脓毒症大鼠肺血管通透性改变

与假手术组相比，脓毒症大鼠的肺组织上清液的OD值增高，（P＜0.01）。而与脓毒症组相比，4-PBA预处理组肺组织上清液的OD值下降了14.7%，（P

＜0.01）。与假手术相比，脓毒症大鼠的肺血管通透性增高，4-PBA可拮抗这一现象。（如图1）

**600** **a**

**b**

**500**

**400**

**300**

**OD值**

**200**

**100**

**0**

**sham**

**CLP**

**PBA+CLP**

图1 脓毒症大鼠肺血管通透性的变化

Sham：假手术组；CLP：脓毒症组；4-PBA+CLP: 4-PBA预处理脓毒症组

a: 与sham相比，P＜0.01 b:与CLP相比，P＜0.01

实验二内质网应激分子标志蛋白在脓毒症大鼠肺血管当中的表达变化

1.内质网应激分子GRP78的表达变化

与假手术组相比，脓毒症大鼠组内质网应激标志蛋白GRP78表达增加，P

＜0.05。与脓毒症组相比，4-PBA预处理加脓毒症组GRP78蛋白的表达降低，

P＜0.05。各组β-actin表达无统计学差异。（如图2）

**GRP78**

**a**

**0.25**

**b**

**0.20**

**GRP78的灰度值**

**0.15**

**0.10**

**β-actin**

**sham** CLP 4-PBA+CLP



**0.05**

**0.00**

**sham**

**CLP**

**PBA+CLP**

图2 脓毒症大鼠GRP78的表达变化

Sham：假手术组；CLP：脓毒症组；4-PBA+CLP: 4-PBA预处理脓毒症组

a: 与sham相比，P＜0.05 b:与CLP相比，P＜0.05

2.内质网应激分子GRP94的表达变化

与假手术组相比，CLP组内质网应激标志蛋白GRP94表达增加，P＜0.01。与CLP组相比，4-PBA预处理加CLP组GRP94蛋白表达下降，P＜0.01。各组β-actin表达没有统计学差异。（如图3）

**GRP94**

**β-actin**

**sham** CLP 4-PBA+CLP

**0.50**

**0.45**

**0.40**

**GRP94的灰度值**

**0.35**

**0.30**

**0.25**

**0.20**

**0.15**

**0.10**

**0.05**

**0.00**

**a**

**b**

**sham**

**CLP**

**PBA+CLP**

图3 脓毒症大鼠GRP94的表达变化

Sham：假手术组；CLP：脓毒症组；4-PBA+CLP: 4-PBA预处理脓毒症组

a: 与sham相比，P＜0.01 b:与CLP相比，P＜0.01

3.内质网应激分子CHOP的表达变化

与假手术组相比，CLP组内质网应激标志蛋白CHOP表达增加，P＜0.01。与CLP组相比，4-PBA预处理加CLP组CHOP蛋白表达下降，P＜0.01。各组的β-actin表达无统计学意义。（如图4）

**a**

**b**

**2**

**CHOP的灰度值**

**CHOP**



**β-actin**

**Sham** CLP  **4-PBA+CLP**



**0**

**sham**

**CLP**

**PBA+CLP**

图4 脓毒症大鼠CHOP的表达变化

Sham：假手术组；CLP：脓毒症组；4-PBA+CLP: 4-PBA预处理脓毒症组

a: 与sham相比，P＜0.01 b:与CLP相比，P＜0.01

实验三脓毒症大鼠肺血管内皮细胞应力纤维的表达及分布

与对照组相比，LPS组细胞F-actin表达增多，细胞呈收缩状态。与LPS组相比，4-PBA预处理加LPS组的F-actin表达相对减少，细胞形态近似正常。







**正常对照LPS** 4-PBA+LPS

Zkq 20151125

# 4、 讨论

烧伤、感染、创伤和休克这些临床的急危重症经常会并发脓毒症。美国每一年都会出现大约75万的脓毒症患者，此中大概有9%的病人进行成严重脓毒症，

3%的病人进展为脓毒性休克，超过28%的病人死亡，是重症医学科中重要的死亡缘由[1]。近几年以来，虽然初期的积极液体复苏、抗感染和有关的器官支持，但整体死亡率仍非常高。脓毒症是指由于感染引发的全身炎症反应综合征（SIRS）。严重脓毒症是指同时伴随着脏器功能障碍、器官组织灌注不良的脓毒症。脓毒性休克是指严重脓毒症病人在给予了充足的液体复苏后仍难以改正的低血压，常伴低灌注状况或器官功能衰竭[1, 2]。

细菌、真菌感染都可以导致脓毒症，引发脓毒症的革兰阴性致病菌多是肠杆菌科，如克雷伯菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌，此中最常见的是大肠埃希菌。大肠埃希菌是普遍存在的条件致病菌，生理情况下存在于肠道内，但当它侵入肠道以外的组织和器官中时则会引起菌血症。大肠杆菌感染常来源于肺部、腹部、皮肤和泌尿道，因菌体内毒素大量入血或细菌在血液中大量繁殖而引起。研究显示细菌外膜的脂多糖是导致脓毒z性kq休 克2重01要51的12启5动因子，细菌内毒素成分所引发

的免疫炎症是致使脓毒性休克的主要原因[3]。

在病原菌感染过程中，巨噬细胞可表达调理性受体、非调理性受体和清道夫受体以识别病原体，并将其吞噬入胞内。随后胞质内膜泡将病原体包裹形成吞噬体，噬天青颗粒和特殊颗粒进入吞噬体形成吞噬溶酶体。溶酶体内的活性氧和

NO可对病原体产生杀伤作用[4]。细菌感染后，天然免疫细胞可经由细胞胞膜上的模式识别受体PRRs去联接细菌外面的病原相关模式分子PAMPs以快速辨认、吞噬和杀伤入侵微生物。Toll样受体（TLR）是人类1997年在人体第一次分离得到的果蝇Toll蛋白的同系物。TLR以通用型受体的方式在抗感染的免疫反应中发挥功用，就是一种TLR可辨认多种病原相关模式分子(PAMPs)。粒细胞、树突状细胞和巨噬细胞上都有TLR4表达，它可以作为脂多糖信号转导的受体，介导相关的信号转导途径以启动天然免疫应答，而且调理适应性免疫应答。细菌胞壁的脂多糖和其他成分是激活天然免疫反应的病原相关模式分子(PAMPs)。病原相关模式分子只会由微生物生成而宿主是不会产生的，所以机体的免疫系统可以特异性地辨识病原相关模式分子。并且对微生物的生存来说，病原相关模式分

子是至关重要的，因而微生物不能够依靠突变病原相关模式分子来躲避宿主的免疫系统[3]。

近年来的研究发现在脓毒症时，患者血清中的降钙素原水平呈现为大幅度升高的趋势，降钙素原并被学者认为可以用来诊断脓毒症及衡量其严重程度。现认为脓毒症时，甲状腺、外周单核细胞和肝脏都可以分泌降钙素原，但目前对于降钙素原在脓毒症当中的作用尚不十分清楚。有学者认为内毒素和细胞因子可以诱发释放降钙素原，而降钙素原可能通过作用于白细胞抑制其释放细胞因子。并认为降钙素原可通过抑制前炎性因子对iNOS的基因表达的促进作用，从而抑制

NO的产生而发挥保护作用[5]。

参与脓毒症发生发展过程的细胞因子包括Ⅰ型、Ⅱ型。活化的淋巴细胞和单核巨噬细胞等都能够分泌TNF-α，它拥有多种生物学功能，普遍介入机体的很多病理生理过程比如局部或全身的炎性反应，介导免疫细胞增殖分化，调节免疫功能。TNF家族受体与其配体结合后致使细胞凋亡或坏死。TNF-α可以通过免疫调节及直接组织损伤作用加重器官损害。研究发现在脓毒症发生过程当中，机体存在着淋巴细胞、单核巨噬细胞和中性粒细胞的凋亡，按照驱动细胞凋亡的始

Zkq 20151125

动信号不同，可分为内源性（由胞内线粒体启动）和外源性细胞凋亡（由胞外凋

亡诱导配体启动）。TNF-α与其受体结合可诱导细胞凋亡，脓毒症也可检测出TNF-α水平增高。但TNF-α在脓毒症免疫细胞凋亡中的作用还不完全清楚，有人认为TNF-α通过促进Fas表达诱导单核细胞凋亡。LPS和TLR4联合后激活

JNK激酶，JNK还能够通过诱导FasL表达增进淋巴细胞凋亡[3]。

缺氧、某些细胞因子和肾素血管紧张素系统、胰岛素可促进血管内皮生长因子（VEGF）的表达，研究提示VEGF和肿瘤、脓毒症的发生过程密切相关，VEGF在脓毒症中发挥的作用主要有增加微血管的通透性，促进损伤的内皮细胞增生并且促进内膜的内皮化，防止新生内膜的异常增厚还有抗血栓形成的作用[6]。现今人们逐渐认识到许多脓毒症患者在度过超炎反应阶段后，会进入以免疫抑制为突出表现的迁延期。此期缺乏如CD4+T细胞、CD8+T细胞和B细胞、树突状细胞等免疫细胞，还可以通过减少细胞表面分子、抑制细胞增多等机制介导免疫抑制。支持免疫抑制的证据包括患者继发新的院内获得性感染和一些隐匿病毒的复活。多项研究提示应用IL-7、阻断PD-1受体和体外血液滤过可以起到免疫治疗的作

用[7]。

脓毒症的发生过程中容易打击机体肾脏，主要机制包括肾脏缺血-再灌注的过程中产生大量的氧自由基和羟自由基，造成脂质过氧化，损害细胞和线粒体膜，导致再灌注性损伤，众多细胞因子如NF - B、一氧化氮合酶及NO、内皮素1和氧自由基的病理作用。基因多态性，研究提示单倍复制或无复制患者的死亡率要低于双倍复制患者。还有肾脏发生细胞凋亡等多种机制造成急性肾脏损伤[8]。单核巨噬细胞产生大量炎性介质和细胞因子，它们能够刺激血管内皮细胞，使内皮表面血栓调节蛋白和硫酸去乙酰肝素的表达下调，组织因子表达增加。内皮表面的组织因子暴露于血浆中会连接Ⅶ/Ⅶa构成复合物，继而活化FⅩ和FⅨ始动凝血级联反应，迅速生成大量凝血酶，导致血液凝固。大量凝血因子的释放和活化又会促进炎症介质的释放，进入恶性循环[9]。

当今脓毒症的治疗主要采取集束化治疗，像6小时复苏集束化治疗，包括血乳酸的测定，应用抗生素之前先留取相应的病原学标本，急诊3小时以内或ICU

1小时以内要应用上广谱抗生素。假使存在低血压或者血乳酸水平大于4mmol/L，

则需给予积极的液体复苏，必要时运用血管活性药物以使中心静脉压达到

mmHg

Zkq 20151125

[11]

8-12、平均动脉压大于或等于65mmHg、尿量大于0.5ml/kg. h

。脓毒症

患者的抗生素的选择早期应采用降阶梯的方式联合应用2种以上的抗生素，一旦确定致病菌，则应针对性使用窄谱抗生素。研究提示液体复苏可通过改善氧输送，抑止炎性反应和下调儿茶酚胺效应发挥抗脓毒症休克的作用[10]。

24小时管理集束化治疗包括运用小剂量的糖皮质激素，血糖的控制及重组人类活化蛋白C和呼吸机的运用。呼吸支持采用生理低限的潮气量，同时调整呼吸频率控制PaCO2，这样可以达到血气正常化的目标，并且缩短通气时间改善预后，避免气压伤[1]。除此之外，有研究显示给予脓毒症患者糖皮质激素冲击疗法不仅不能降低死亡率，反而诱发应激性溃疡、高血糖等并发症。糖皮质激素在中等剂量时并没有出现高血糖及消化道出血等不良反应，且研究证实中等剂量的糖皮质激素对脓毒性休克也有效，但目前还没有研究能够证实其对不伴有休克状态的脓毒症同样存在效果，因此要严格控制其使用的适应症。脓毒症患者常有胰岛素抵抗和高血糖等伴发症，而且有研究认为血糖为影响脓毒症预后的独立要素，血糖每增高2.8mmol/L，死亡风险增加75%。血糖控制在3.9-6.1mmol/L会更有效的降低脓毒症的发生率和死亡率[11]。炎症反应是脓毒症的病理生理过程中

重要的参与环节，研究显示HMGB-1合成的抑制剂有助于调节致炎/抗炎反应平衡，有利于维持内环境的稳态，依立托仑四钠可通过阻碍TLR4的信号通路来抑制炎症反应。现认为乌司他丁、胸腺肽α1、血必净及一些中药都可以降低脓毒症时炎症反应起到相应治疗作用[12]。

在脓毒症的发生发展过程中，因为各种原因诱发的毛细血管通透性的升高，致使体液和大量血浆蛋白渗透到组织间隙，出现全身性水肿、多浆膜腔积液、低血容量性休克及急性肾缺血等临床表现，导致患者病情危重。急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征为脓毒症患者肺部常见的并发症，体现为非心源性肺水肿，肺不张等，为肺内毛细血管通透性增高导致的大量含蛋白的体液进入间质及肺泡内，引起难以纠正的低氧血症。严重的消化道水肿造成胃肠道免疫功能紊乱、上皮功能受损、肠道菌群失调、细菌移位等，加重患者的全身感染。另外，有研究提示在脓毒症患者的肝脏中也存在普遍的毛细血管通透性的升高[14]。Seely等研究脓毒症急性肾衰竭模型显示，在脓毒症发生的前6个小时，肾脏血流已经下降了

61%，而有持续滤过功能的肾皮质肾小球的数量下降至48%。通过液体复苏、提

升血压等方法促进恢复肾脏的血液灌注后，肾功能仍没有得到改善，这些提示血

Zkq 20151125

管渗漏在急性肾功能衰竭的发生过程中起着重要作用。另外，脓毒症患者神经系

统、内分泌系统和心肌等均存在明显的血管渗漏，这是导致脓毒症患者多脏器功能不全的主要原因[14, 22]。

脓毒症微循环的改变现已被观测到，如血管密度的减少及血液供给的改变，这些现象可能是因为自我调节机制的失常，如某些区域诱导型一氧化氮合酶表达的减少导致血管不能维持正常的血液灌注，还可能引起内皮损伤、皮下胶原暴露和微血栓的形成[15]。

目前研究显示脓毒症致血管渗漏主要发生在微静脉，少见于毛细血管。5-羟色胺、组胺、白三烯、缓激肽、脂多糖和缺血再灌注损伤等都可以导致微静脉通透性增高，血浆渗出和白细胞的游出。现认为血管内皮细胞在微静脉通透性增高过程中发挥重要作用。大分子物质透过微静脉主要有细胞旁途径和穿细胞途径两种通路。大分子物质还可以通过囊泡-空泡细胞器VVOs直接穿过内皮细胞[18]。

因为内皮间裂隙是血管渗漏的主要途径，内皮间连接及蛋白成为研究的焦点。其中含有内皮细胞间的紧密联接和粘附联接，内皮细胞和基底膜间的粘附联

接。紧密联接使内皮细胞的两层胞膜紧挨在一起，之间没有缝隙。咬合蛋白、闭合蛋白、带状闭合蛋白和连接粘附分子等参与构成紧密联接。在炎症介质作用下，骨架蛋白活动和内皮细胞收缩，导致连接蛋白结构功能失调，胞间裂隙形成[17]。

内皮间粘附联接主要包括钙粘蛋白和四螺旋蛋白。内皮钙粘蛋白氮端位于胞外，与相邻细胞的钙粘着蛋白的氮端相连接，碳端与胞质内连环蛋白相连，连环蛋白又和骨架肌动蛋白相连，细胞外的基质和细胞内的骨架蛋白借助这种锚定作用成为一个整体。炎性因子可磷酸化连环蛋白和钙粘蛋白，降低骨架蛋白、连环蛋白和钙粘蛋白的联合数目，弱化胞间粘附的强度，促进内皮细胞的收缩和胞间裂隙的形成[18]。

内皮细胞与基底膜间的粘附主要由整合蛋白等组成。整合蛋白的胞外区可以通过连接胞外基质中的配基起到粘附作用，胞内区可以通过结合α辅肌蛋白、纽蛋白和踝蛋白继而连接肌动蛋白。因此整合蛋白和基底膜蛋白结合产生的信号可经过此通路传人细胞，介导细胞骨架重构和形态变化，而细胞骨架的变化也会通过此条途径影响基底膜。

以上各种连接蛋白均经由各种方式和细胞骨架相连接，使细胞外基质和细胞

Zkq 20151125

骨架相互作用并构成整体，细胞骨架的任何改变和连接蛋白本身的破坏都可能导

致内皮屏障功能的损害和血管通透性的增高[17]。

细胞骨架有胞质骨架和胞核骨架两种形式，微管、微丝和中间丝构成细胞质骨架。微丝的基本组分是肌动蛋白（actin），肌动蛋白有G-actin和F-actin两种主要形式。G-actin是一种可溶性单体，在一定条件下可组装成纤维状的肌动蛋白F-actin。肌动蛋白的单体和聚合体这两种形式能够通过这种可逆性的聚合在一定程度上保持稳态。在生理状态下，微丝分布在细胞的周边部位，而在炎症状态中，微丝会发生重组，细胞周边的纤维丝逐渐消失，肌动蛋白在胞质中构成成捆的纤维束，成为应力纤维。应力纤维相当于骨骼肌细胞内的肌原纤维，能使非肌肉细胞产生收缩[18]。

目前认为血管通透性增高有三方面的原因，毛细血管内皮细胞间的通透性增强，血管内皮凋亡增加和细胞被膜的破坏[15]。脓毒症时局部缺氧和腺苷的增加促使VEGF的大量释放，VEGF可以活化内皮上受体依赖的钙离子通道，提升胞内钙离子浓度，增加血管的通透性。VEGF还能够收缩内皮周围的外周细胞，促进

胞间裂隙的形成致使血管渗漏[19]。有实验认为凝血酶能够引发肌动蛋白的收缩和应力纤维的形成，使内皮细胞产生收缩活动致使胞间裂隙的形成。有研究认为血管内皮分泌的血管生成素2可经由Ang/Tie-2的途径引发血管渗漏[20]。

已有研究显示多种机制参与调节血管通透性，如升高的胞内钙离子浓度能通过连接钙调蛋白，构成钙-钙调蛋白复合物，活化依靠钙-钙调蛋白的肌球蛋白轻链激酶(MLCK)，MLCK能经由影响肌球蛋白轻链的磷酸化水平来调理内皮的通透性。肌球蛋白轻链激酶（MLCK）的活化能够提升肌球蛋白轻链（MLC）的磷酸化水平，后者激活肌球蛋白重链头部的ATP酶，使F-actin滑动、细胞收缩。其中许多蛋白激酶通路参与MLC的磷酸化如络氨酸激酶通路、MAPK通路等

[24,25]. Rock作为RhoA的下游靶分子能够经由抑制肌球蛋白轻链磷酸酶MLCP的活性来提升肌球蛋白轻链（MLC）的磷酸化水平，从而促进应力纤维的形成，最终增加了内皮的通透性[23]。

目前对于脓毒症血管通透性改变的防治措施，主要围绕其引起血管渗漏的诱发因素和发生机制进行。一是降低炎症反应，如通过阻断内毒素-TLRs介导的促炎反应，干预TLRs的信号通路，减轻过度的炎症反应进而改善脓毒症患者的预后。二是抑制引起血管通透性增高的机制。磷酸二酯酶-4抑制剂能够提升内皮细胞内的cAMP水平，有效减轻脂多糖诱导的毛细血管通透性的增高，最终能够减少用于复苏的液体量[14]。此外，有学者认为应从改善低氧和免疫功能，维持有效循环血量，降低血管渗漏和连续血液净化等方面给予综合治疗[28]。

有研究显示抗坏血酸可能通过抑制一氧化氮和过氧化物酶的表达进而发挥对内皮屏障的保护作用。临床上用的人血白蛋白是一种天然胶体扩容剂，近年来研究显示通过提高白蛋白的输注速度或改变白蛋白的结构来延长白蛋白的半衰期，促进其有效的吸收组织中的蛋白和水分，改善组织水肿。其他常用的人工胶体有琥珀酰明胶和羟乙基淀粉等，羟乙基淀粉的分子量比较大，可以堵塞血管的渗漏，并且可以阻碍白细胞和内皮细胞的相互作用，抑制炎性介质的释放，进而改善炎症反应、内皮损伤和改善微循环渗漏[14, 27]。

内质网是真核细胞内一种重要的细胞器，对细胞内部和外部环境的改变是相当敏感的。缺血损伤、氧化应激、钙稳态紊乱均可引起其功能紊乱，当打破了蛋白质合成、成熟和降解之间的平衡，内质网腔内错误折叠或未折叠蛋白积聚和钙

平衡紊乱的情况，称为内质网应激。内质网应激（ERS）是细胞在胞内外各种刺激因素作用下做出的一种适应性反应，然而假使内质网应激的程度过强或者时间过长会致使细胞发生凋亡[29]。内质网腔内错误折叠或未折叠蛋白积聚促使细胞做出的适应性反应，称为未折叠蛋白反应（UPR）。未折叠蛋白反应最先显示为蛋白的合成停歇，随后应激反应蛋白的基因表达，可提高细胞的生理状态，但如果应激强度超过细胞的承受能力时，内质网会诱发独特的内质网相关的细胞凋亡通路，以清除损伤严重至难以修复的细胞[30]。

内质网应激早期会介导蛋白质合成暂停，主要机制为GRP78转而结合内质网腔内增多的未折叠蛋白，而与PERK分离。PERK随后能够经由磷酸化自己的胞内结构域而活化，活化后的PERK磷酸化了翻译起始因子eIF2α，迅速的降低了起始mRNA，缓解了内质网腔内蛋白的合成负荷，减弱了内质网压力。PERK介导eIF2α的磷酸化能够中止mRNA翻译，随后因为缓解了折叠蛋白的负荷而阻止错误折叠蛋白的聚集，使细胞生存下来。内质网应激的中期会出现整合应激反应，机制为磷酸化的eIF2α不仅促进了蛋白质合成的恢复，还促进了一些特异性应激蛋白的表达。研究显示GADD34基因能够使磷酸化的eIF2α脱磷酸化，从而恢复蛋白质的合成。当细胞受损严重无法恢复至正常生理状态时，内质网应激会启动凋亡途径清除这些细胞[29]。

内质网膜上有三种感受器蛋白能够感应腔内未折叠蛋白的积聚，为跨膜蛋白激酶1（IRE-1α），激活作用转录因子（ATF6）及双链RNA依赖的蛋白激酶样内质网激酶（PERK）。这三种蛋白能够感应内质网信号并介导三种过程包括细胞周期阻滞，细胞保护性信号途径和细胞凋亡性信号途径[30]。已知内质网导致细胞死亡有以下几种机制：一为线粒体Apaf-1依赖途径。二为Caspase-12活化途径，过度的内质网应激使Caspase-12活化，并使Caspase-7转运至内质网的表面。前Caspase-12和Grp78、前Caspase-7能够构成复合物，但过强的刺激会裂解这一复合物，并释放出有活性的Caspase-12。有活性的Caspase-12经由剪切活化的Caspase-3从而介导细胞凋亡。三为钙离子信号途径，有研究显示内质网内钙稳态的破坏会引发细胞凋亡[32]。其他还有一些已知的同样可以介导细胞凋亡的途径包括JNK的活化、CHOP蛋白表达增强等[30]。

现有学者认为葡萄糖调节蛋白78 （GRP78）是热休克蛋白70家族的成员

之一。GRP78具备分子伴侣的作用，介入蛋白质的折叠和转运，在应激状态下大量表达以维护内质网的稳定。蛋白质的错误折叠、葡萄糖的缺乏和Ca2+-ATPase抑制剂都可以促进GRP78的基因转录，诱导产生GRP78。诱导因素如内质网应激诱导剂，糖基化拮抗剂，细胞毒性的免疫反应和内环境的转变都能够促进GRP78基因的表达[33]。GRP78能够增进蛋白质在正常生理情况下的成熟，以非共价键的方式和新生多肽在真核细胞内质网膜上短暂的结合，随后散开，以增进蛋白质精确的折叠组装，并且协助蛋白转运至特定的位置。GRP78还是钙结合蛋白，在应激情况下其表达明显增强以维持内质网稳态及内环境的稳定。另外，GRP78能够减弱细胞对于杀伤性T细胞的敏感性，阻碍细胞凋亡。GRP78还能够通过把内质网腔内的错误折叠蛋白质移动出去，维持蛋白质在应激状态下进行合成。因此，近年来认为GRP78在应激状态下的高表达应该是要紧的细胞防御机制。GRP78还是启动ERS和内质网稳态调节的关键因子之一，在一定程度上可反映ERS的启动和稳态调节能力[ 34]。糖调节蛋白94（GRP94）是热休克蛋白90家族的成员之一，为内质网腔内比较充沛的蛋白质，各种病理性刺激如蛋白质装配不彻底、蛋白质的折叠发生错误、葡萄糖缺乏和胞内储钙的排空都可以促进GRP94的表达增高。GRP94也具有帮助未折叠或错误折叠的蛋白质正确折叠的作用，GRP94的表达上调也是内质网应激的标志之一[35-37 ]. CHOP蛋白作为内质网应激诱导产生的凋亡信号分子，在细胞增殖分化和死亡中起重要作用， 同时也是内质网应激凋亡反应的直接结果[29, 38]。

已知ERS参与多种疾病的病理生理过程如动脉粥样硬化、糖尿病、帕金森病和肿瘤等。研究显示高同型半胱氨酸血症可以诱导内质网发生未折叠蛋白反应，增强CHOP、TDAG51的表达及胆固醇的合成，最终导致巨噬细胞凋亡，巨噬细胞的碎片沉积在血管壁形成动脉粥样硬化[42]。Majors AK等人发现培养的动脉平滑肌细胞在伴有内质网应激时会结合更多的白细胞。而且在加入内质网应激诱发物质硫酸右旋糖苷会剧烈诱发白细胞粘附，炎症介质的释放[43]。有学者认为下调JNK会增强胰岛素抵抗，而在胰岛素抵抗的情况下，巨噬细胞会对内质网应激相关凋亡更敏感。Okada等研究主动脉缩窄致大鼠心力衰竭模型中发现该模型存在持续的内质网应激，并且CHOP途径受到激活[44]。在心肌梗死致心力衰竭模型中同样发现持续的内质网应激，并且认为JNK、CHOP和caspase-12都参与

了心肌细胞的凋亡[45]。

现认为未折叠蛋白反应能够经由抑制缺血再灌注时细胞内的钙超载来减轻再灌注的细胞损害。如Ⅰ2postC能够抑制JNK的磷酸化发挥对细胞的保护作用，表明事先启动内质网应激可以经由改善胞内钙超载而对细胞起到保护作用。在脑缺血再灌注模型中发现胞内钙超载和产生的活性氧、一氧化氮可以触发内质网应激，炎症反应和内质网应激也可相互促进。依达拉奉能够通过减少CHOP和caspase-12的生成对脑卒中病人起到保护作用[46]。

内质网应激的PERK-eIF2α磷酸化通路调控着胰岛素合成和释放。研究提示

Akita鼠因为错误折叠胰岛素的堆积触发了内质网应激促进了Akita鼠发生糖尿病，而裂解CHOP基因或敲除Ins2基因能够明显降低血糖的升高。提示持续的内质网应激可能通过诱导β细胞的凋亡促进糖尿病的发生[47, 48]。

很多实验认为内质网应激及其介导的细胞凋亡和多种肝脏疾病的发生有着紧密的联系，如病毒性肝炎、酒精性肝病、中毒性肝损伤、非酒精性脂肪性肝病、急性肝衰竭和肝癌[49-51]。此外，研究显示，肿瘤内部存在的缺氧引发的应激会使肿瘤恶性程度增高，UPR和PERK-eIF2α途径会促使肿瘤休眠使其对放化疗的敏感性降低。PERK-eIF2α途径、IRE-XBP1和ATF6途径可帮助肿瘤细胞对低氧环境产生适应，而抑制这三条通路则可促使肿瘤细胞发生凋亡[52]。

Schidberg等研究显示LPS刺激人脐静脉内皮细胞导致内质网超微结构严重损伤和内皮细胞凋亡。许多研究表明，脓毒症血管内皮存在ERS，而且内质网应激诱发细胞的功能障碍甚至凋亡也是脓毒症发生多脏器功能障碍的细胞学基础

[54,55]。

4-苯基丁酸已知为一种小分子伴侣，可通过运输突变蛋白，稳定蛋白构象而改善内质网折叠能力从而减轻内质网应激。为多种疾病的治疗研究提供新的途径。有研究显示4-苯基丁酸可对棕榈酸诱发的胰岛细胞内质网应激发挥下调作用，对细胞凋亡也有一定的抑止作用[56-58]。因此，本研究旨在建造脓毒症大鼠内质网应激模型，并检测模型内质网应激标志蛋白GRP78、GRP94和CHOP的表达变化，及内质网应激标志蛋白和血管通透性转变的相关性。

本实验选用盲肠结扎穿孔术建造脓毒症大鼠模型，诱导其发生内质网应激。通过检测内质网应激标志蛋白表达的改变和血管通透性的变化，查明内质网应激

和脓毒症血管渗漏之间的关系。并运用4-PBA预处理抑制内质网应激，从而进一步验证内质网应激在脓毒症血管通透性增高中发挥的作用。实验结果显示与对照组比较，脓毒症模型组内质网应激标准蛋白的表达增高，血管通透性增高。而应用4-苯基丁酸改善内质网应激后，和单纯脓毒症模型组相比，GRP78、GRP94和CHOP蛋白的表达降低，血管通透性也降低。结果表明内质网应激在脓毒症血管通透性增高中起重要作用，但具体机制仍需进一步阐明。

国内外研究表明，GRP78大概介入了调理IP3R的活性。GRP78可促进IP3R1四聚体的组装，GRP78和新生成的IP3R1单体相互作用并结合以保证IP3R1单体的精确组装。内质网应激时，GRP78和IP3R1的相互作用受损导致IP3R1功能异常，IP3R1通过改变Ca2+信号加速神经细胞死亡。GRP78的表达增强能明显促进IP3R介导的Ca2+释放。以上研究表明，GRP78大概是通过介入调理了IP3R的活性这一过程才具有影响内质网内钙离子释放的作用[59-61]。

另外，CHOP蛋白可经由ER氧化酶1α（ERO1-α）活化IP3R从而促使细胞凋亡，而小干扰RNA(siRNA)基因通过抑制ERO1-α从而阻碍细胞凋亡。这说明CHOP蛋白大概也介入调理IP3R的活性，并进而影响了内质网内Ca2+的释放

[62,63]。

内皮细胞胞外钙的内流和胞内钙库的释放促使胞浆内钙离子浓度提升，并进一步激活下游的信号转导通路，引起内皮屏障功能的变化。细胞内钙离子与多种细胞骨架和调节蛋白结合，这些蛋白质功能的变化可以直接或间接地改变内皮的通透性。此外，升高细胞内钙离子浓度可以激活PKC，PKC这种蛋白激酶能够直接作用于肌球蛋白轻链的丝/苏氨酸残基，导致MLC发生磷酸化，也可以经由激活肌球蛋白轻链激酶(MLCK)，引发肌球蛋白轻链磷酸化，最终发生细胞结构蛋白的重组排列[24]。

凝血酶作用于细胞，升高了胞内Ca2+浓度，钙离子和钙调蛋白连接形成钙

-钙调蛋白复合物，活化肌球蛋白轻链激酶后引发肌球蛋白轻链磷酸化。MLC磷酸化后便激活了肌球蛋白重链头部的三磷酸腺苷酶，释放出能量能够促使组成细胞骨架的F-actin微丝滑动，细胞显示收缩活动促使胞间裂隙形成，内皮通透性因而增加[60]。廷斯利等人通过把MLCK直接导入分离培养的毛细血管静脉后观察到内皮细胞通透性的增高，而肌球蛋白轻链激酶抑制剂的使用或下调胞内钙离

子浓度能够阻碍凝血酶引导的内皮通透性的增高，维护内皮的屏障功用。这些表明MLCK 介入了凝血酶引导的内皮通透性转变的信号传导过程[64, 65]。

此外，PKC还可以直接或间接的通过影响纽带蛋白、钙调蛋白等细胞骨架蛋白的丝氨酸/苏氨酸的磷酸化，从而介导细胞骨架蛋白的重新分布，致使内皮细胞收缩，胞间裂隙形成，最后内皮细胞间通透性得以增加[24, 25]。

实验结果显示，脓毒症大鼠血管内皮细胞产生内质网应激，血管内皮通透性增高。同时，F-actin表达不规则，细胞呈收缩状态。加入4-苯基丁酸预处理后，肌动蛋白的表达相对减少，细胞形态近似正常。提示内质网应激可能通过影响肌动蛋白的表达，导致血管通透性的改变。

**全文结论**

1.脓毒症能够诱发血管内皮细胞产生内质网应激。内质网应激介入了脓毒症血管通透性上升的过程，内质网应激标志蛋白是介入脓毒症血管通透性上升的重要分子。

2.内质网应激大概经由调节血管内皮细胞应力纤维形成继而调节血管通透性。

3.4-PBA可能通过抑制内质网应激，抑制内皮细胞应力纤维形成从而降低血管通透性。

参考文献

[1] 王正国. 当前脓毒症研究的思考[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(11): 841-844.

[22] 马朋林. 认识与挑战: 脓毒症流行病学变化的启示[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(11): 1015-1018.

[3] 王月华, 李妍. 脓毒血症发病机制研究进展[J]. 中国病原生物学杂志. 2010, 5（4）: 299-303

[4] 刘艳存, 柴艳芬, 姚永明. 巨噬细胞在脓毒症发病机制中的作用研究进展[J]. 中华危重病急救医学. 2013, 25（4）: 247-250.

[5] 刘宁, 降钙素原在脓毒症中的作用[J]. 国外医学外科学分册. 2002, 29(2): 68-70.

[6] 郭文璐. 血管内皮生长因子的研究现状及其与脓毒症的关系[J]. 国际儿科学杂志. 2007, 34(2): 110-113.

[7] 陈明祺, 王醒. 脓毒症患者免疫功能障碍研究进展[J]. 东南大学学报. 2013, 32(3）: 357-360.

[8] 宋理毅, 史国辉. 脓毒症急性肾损伤的机制[J]. 华北煤炭医学院学报. 2011, 13(3）: 339-341.

[9] 李鑫, 马晓春. 脓毒症凝血功能障碍[J]. 中国实用外科杂志. 2009, 29(12): 1055-1057.

[10] 牛晓蓉, 顾勤. 脓毒性休克液体复苏的治疗进展[J]. ft东医药. 2013, 53(38): 102-105.

[11] 王海彦, 廖品琥. 脓毒症集束化治疗的临床研究进展[J]. 天津医药. 2013, 41（4）: 392-395.

[12] 汤超, 刘朝奇. 脓毒症免疫干预措施的研究进展[J]. Chinese General Practice. 2013, 16(3C): 1020-1022.

[13] 李小丽, 朱永健. 早期连续性静-静脉血液滤过治疗对脓毒性休克容量复苏的影响[J]. 中华急诊医学杂志. 2012, 21(3): 318-320.

[14] 魏海苓. 脓毒症毛细血管渗漏的研究进展[J]. 感染、炎症、修复, 2013, 14(2): 126-128.

[15] 周昕怡, 方向明. 从宏观到微观—危重症中的微循环障碍及其诊疗进展[J]. 现代实用医学. 2012, 24(2): 123-125.

[16] 刘妍, 张碧丽. 脓毒症致毛细血管渗漏综合征35例[J]. 实用儿科临床杂志. 2012, 27（12）: 928-930.

[17] 赵克森, 黄巧冰. 血管通透性增高的基本机制[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19（4）: 549-553.

[18] 景炳文. 毛细血管内皮细胞膜结构与血管通透性[J]. 中华损伤与修复 杂

志.2013,8(5):461-463.

[19] 刘毅. VEGF在脓毒症毛细血管渗漏中的作用[J]. 国际内科杂志. 2009, 36(1): 34-36.

[20] 温占兵, 李真玉. 血管生成素-2与严重脓毒症肺毛细血管渗漏的相关性研究[J]. 天津医科大学学报. 2013, 19(6): 474-477.

[21] Yann Wallez 1, Philippe Huber. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis[J]. Science Direct. 2008: 794-809.

[22] 李瑜. 高同型半胱氨酸血症导致血管内皮细胞功能损伤机制的研究进展[J]. 新疆医科大学学报. 2009, 32(5): 654-656.

[23] 国伟, 孟建中, 陈宇. Rho/Rho激酶信号通路与血管内皮通透性的研究[J]. 生物医学工程研究, 2009, 28(2): 154-158.

[24] SarahY. Yuan. Proteinkinasesignalinginthemodulationofmicrovascular permeability. Vascular Pharmacology. 2003: 213–223.

[25] Qiang Shen Robert R, RigorChristopher D. Pivetti, Mack H. Wu, and Sarah Y. Yuan. Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function[J]. Cardiovascular Research, 2010, 87: 27–280.

[26] Lichun Wang, Steven M. Dudek. Regulation of vascular permeability by sphingosine 1-phosphate[J]. Microvascular Research. 2009: 39-45.

[27] 景炳文, 林兆奋. 关于毛细血管渗漏综合征救治中有关问题的讨论[J]. 中国危重病急救医学. 2009, 21(12): 705-706.

[28] 李亚莉, 李志军. 毛细血管渗漏综合征的治疗进展[J]. 中国中西医结合急救杂志. 2014, 21(1): 77-78.

[29] 李载权, 周爱儒. 内质网应激反应分子机理研究进展[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(3): 283-288.

[30] 刘丽丽, 郭启煜. 未折叠蛋白反应的信号通路[J]. 中国医药生物技术. 2009, 4(6): 455-457.

[31] 冯献启, 邹萍. 内质网应激反应性凋亡途径途径研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册. 2004, 31(10): 726-730.

[32] 谭贝加, 马红, 王明艳. 线粒体、内质网与细胞凋亡[J]. 临床医学. 2007, 20(3): 504-506.

[33] 张莹. GRP78的研究进展[J]. 国外医学生理病理科学与临床分册. 2005, 25（3）: 251-253.

[34] 刘友平, 严冬梅. PI3K/Akt调控内质网应激对GRP78的诱导[J]. 中国病理生理杂志. 2011, 27(4): 749-754.

[35] 万义福, 许宝华. 大鼠严重烧伤后心肌细胞GRP 94表达变化及其意义[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(2): 43-47.

[36] Davide Eletto, Devin Dersh. GRP94 in ER Quality Contol and Stress Resposes. NIH Public Access. 2010, 21(5): 479-485.

[37] 俞泽元, 高鹏. 内质网分子伴侣糖调节蛋白94在非酒精性脂肪肝中的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志. 2008, 16(31): 3566-3570.

[38] 胡畔, 李涛, 丁晓莉. GRP78和CHOP蛋白表达增加与脓毒性休克大鼠肺血管通透性改变的关系[J]. 第三军医大学学报. 2013, 35(9): 854-857.

[39] Cheng-ChengShao, Nan Li, Jian Su. Cadmium supplement triggers endoplasmi reticulum stress response and cytotoxicity in primary chiken hepatocytes[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2014: 109-114.

[40] TETSUOADACHI1, HIROYUKIYASUDA1. Endoplasmic reticulum stress induces retinalendothelial permeability of extracellular-superoxide dismutase[J]. Free Radical Research. 2011, 45(9): 1083–1092.

[41] Tetsuo Adachi, Mayumi Teramachi. Contribution of p38 MAPK, NF- kB and glucocorticoid signaling pathways to ER stress-induced increase in retinal endothelial permeability[J]. Archivesof Biochemistry and Biophysics. 2012 : 30–35.

[42] 陈鹏, 杨成明. 内质网应激反应与心血管系统疾病[J]. 心血管病学进展. 2009, 30(2): 315-319.

[43] Majors AK, Austin RC, Motte CA, et al. Endoplasmic reticulum stress induces hyaluronan deposition and leukocyte adhesion[J]. Biol Chem, 2003, 278(47): 47223-47231.

[44] Gargalovic PS, GharaviNM, Clark MJ, et al. The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells [J]. Arterio2 scler Thomb Vasc Biol, 2006, 26(11): 2490-2496.

[45] 陈鹏, 杨成明, 曾春雨. 心肌梗死后心力衰竭小鼠心肌组织内质网应激相关凋亡途径的研究[J]. 中国病理生理杂志. 2010, 26(6): 1069-1074.

[46] 武彩霞, 刘睿. 内质网应激与脑缺血/再灌注损伤[J]. 中国药理学通报. 2013, 29(5): 601-605.

[47] 张忠彬, 夏昭林. 内质网应激与疾病[J]. 国外医学卫生学分册. 2003, 30(3): 141-145.

[48] 董 毅 龙, 张 能. 内 质 网 应 激 与 糖 尿 病 [J]. 国 外 医 学 生 理 、 病 理 科 学 与 临 床 分册. 2004, 24(6): 508-510.

[49] 王 洪 岩, 刘 晓 珺. 内 质 网 应 激 与 肝 脏 疾 病 研 究 进 展 [J]. 世 界 华 人 消 化 杂志. 2012, 20(6): 451-459.

[50] 刁 青, 甄 真. 内 质 网 应 激 在 肝 脏 疾 病 发 病 机 制 中 的 作 用 [J]. 国 际 内 科 学 杂志. 2009, 36(11): 665-671.

[51] 钟 卫 卫, 林 世 德. 内 质 网 应 激 与 肝 损 伤 研 究 进 展 [J]. 世 界 华 人 消 化 杂志. 2010, 18(10): 1021-1025.

[52] 原 玉 芬, 杨 惠 玲. 内 质 网 应 激 与 肿 瘤 细 胞 的 凋 亡 [J]. 分 子 诊 断 与 治 疗 杂志. 2010, 2(2): 128-134.

[53] 丘雅维, 陈燕铭. 高糖诱导内质网应激对血管内皮细胞炎症. 中ft大学学报. 2013, 34（1）: 59-64.

[54] 尹雪莲. 内质网应激和常见危重症[J]. 中国急救医学, 2011, 31(6): 551-554.

[55] 姚永明, 祝筱梅. 提高内质网应激在脓毒症中作用及意义的认识[J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22(9): 513-515.

[56] 孙琦, 向若兰, 张文龙, 杨燕丽, 李娟, 张葵, 丁文一. 4-苯基丁酸抗内质网应激诱导胰岛β细胞凋亡[J]. 解剖学报, 2012, 43(6): 784-788.

[57] 何玉莲, 熊燕, 张梅. 4－苯基丁酸对糖尿病大鼠的心脏保护作用[J]. 中国药理学通报, 2014, 30((8): 1137-41.

[58] 于平, 孙琦, 潘慧, 安芳, 朱惠娟. 4－苯基丁酸对棕榈酸诱导的胰岛β细胞内质网应激的效应[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(14): 2004-2006.

[59] Ribeiro CM, Boucher RC. Role of endoplasmic reticulum stress in cystic fibrosis-related airway inflammatory responses[J]. Proc Am Thorac Soc. 2010 Nov; 7(6): 387-394.

[60] 林可; 赵连友; 黄金燕; 尚福军; 艾永飞; 胡中伟; 刘沙沙; 高血压大鼠心肌内质网应激时GRP78和CHOP的表达及其与心肌细胞凋亡的关系[J]. 心脏杂志, 2010, 22(6): 828-832.

[61] Tjondrokoesoemo A, Li N, Lin PH, et al. Type 1 inositol (1, 4, 5) -trisphosphate receptor activates ryanodine receptor 1 to mediate calcium spark signaling in adult mammalian skeletal muscle[J]. J Biol Chem. 2013 Jan 25; 288(4): 2103-2109.

[62] Monaco G, Beckers M, Ivanova H, et al. Profiling of the Bcl-2/Bcl-X(L) -binding sites on type 1 IP(3) receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Nov 9; 428(1): 31-35.

[63] Xing X, Li Y, Liu H, Wang L, Sun L. Glucose regulated protein 78 (GRP78) is overexpressed in colorectal carcinoma and regulates colorectal carcinoma cell growth and apoptosis[J]. Acta Histochem. 2011 Aug; 95(8): 1151-1156.

[64] Tiruppathi C, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB. Ca2+ signaling, TRP channels, and endothelial permeability[J]. Microcirculation. 2006 Dec; 13(8): 693-708.

[65] Townsley MI, King JA, Alvarez DF. Ca2+ channels and pulmonary endothelial permeability: insights from study of intact lung and chronic pulmonary hypertension[J]. Microcirculation. 2006 Dec; 13(8): 725-739.

致 **谢**

时间如白驹过隙，三年的研究生涯活即将结束，站在毕业的门槛上，回首往昔，奋斗和辛劳成为丝丝的记忆，甜美与欢笑也都尘埃落定。

感谢付贵峰老师三年来在我学习、工作、生活上的悉心关系和帮助，导师渊博的专业知识，严谨的治学态度，精益求精的工作作风，诲人不倦的高尚师德，朴实无华、平易近人的人格魅力对我影响深远。导师不仅授我以文，而且教我做人，虽历时三载，却赋予我终生受益无穷之道。

感谢第三军医大学大坪医院野战外科研究所二室重刘良明主任、李涛副主任和各位师兄师姐在我的课题完成中给予的真诚指导与热心帮助。

在临床实习过程中，衷心感谢李跃东主任的耐心指导，程礼川主治医师丰富的临床经验及严谨的临床思维使我受益匪浅。感谢吴泽华、何修玉医师在我研究生学习期间给予的热切关心和鼓励，在此向他们致以崇高的敬意。

**附录** **A**

**英文缩略语表**

英文缩写 英文全称 中文全称

ER Endoplasmic Reticulum 内质网

ERS Endoplasmic Reticulum Stress 内质网应激

GRP78 Glucose-regulated proteins 78 糖调节蛋白 78

CHOP CCAT/enhancer-binding proterin-homologous protein

CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白

CLP Cecal Ligation and Puncture 盲肠造瘘术

NS Normal Saline 生理盐水

OD Optical Density 光密度

IP3 Inositol triphosphate 3 三磷酸肌醇

PBS Phosphate Buffer Solution 磷酸盐缓冲液

WB Western Blot 蛋白质印迹

PAGE PolyacrylAmide Gel Electrophoresis 聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS sodium dodecyl sulfate 十二烷基硫酸钠

UPR unfolded protein response 未折叠蛋白反应

siRNA small interfering RNA 小干扰 RNA

h Hour 小时

MLCK myosin light chain kinase 钙调蛋白依赖的肌球蛋 白轻链激酶

PKC protein kinase C 蛋白激酶 C

AJ adherent junctions 黏着连接

XBP-1 X box protein-1 X 盒结合蛋白 1

PDE4 Phosphodiesterase 4 磷酸二酯酶 4

min Minute 分钟

**附录** **B**

**内质网应激与脓毒症血管通透性的变化宋仁杰综述付贵峰校审**

**【摘要】**脓毒症血管渗漏是一个复杂的过程，涉及到多条信号途径，具体机制尚未完全阐明。内质网应激（ERS）是细胞在胞内和胞外各种应激因子刺激下做出的一种适应性反应，太强程度或太长时间的ERS可致使细胞凋亡。已知脓毒症诱发了血管内皮内质网应激，现就内质网应激在脓毒症血管通透性增高当中的作用做一综述。

【关键词】脓毒症； 血管渗漏； 内质网应激

血管通透性是指血液中的成分经由微血管壁透出到血管外的能力。它是评价各种脏器、组织、细胞与血液进行物质交换能力的重要指标。休克、烧伤、炎症、免疫、肿瘤转移等一系列病理过程的发生和发展均涉及血管通透性的增高，血管渗漏更是晚期休克患者死亡的主要原因之一[1]。现有研究表明，机体在发生休克、炎症、烧伤、免疫、肿瘤转移等反应时会导致血管内皮的损伤，增加血管的通透性。临床上，血管通透性的改变会导致很多病理过程，如组织器官水肿和动脉粥样硬化等。多种疾病的发生及发展与这些病理过程有着紧密的联系，像肺水肿会进一步致使急性肺损伤的恶化和急性呼吸窘迫综合征，心肌水肿和动脉粥样硬化引发冠心病等心血管疾病的发展等等，严重影响器官的功能。特别是在脓毒性休克的晚期会发生明显的毛细血管通透性的增高[3, 7]。

一、脓毒症的临床意义。

脓毒症是感染导致的全身炎症反应综合征（SIRS）,证明有细菌或高度怀疑的感染灶的存在。虽然脓毒症是由感染引起，然而其一旦引发后，发生发展的过程有其自身的规律，因此现在认为从根本上说，脓毒症是机体对感染性因素的反应[3]。

脓毒症发生率高，据不完全统计，全球每年有2千多万人罹患脓毒症，每天约14,00人死于脓毒症。据国外流行病学调查表明，脓毒症的病死率已经超过心肌梗死成为重症监护病房内非心脏病人死亡的主要原因[4]。

当今脓毒症的治疗主要包括初期目标治疗，通过液体复苏以使中心静脉压达到8-12mmHg、平均动脉压大于65mmHg、尿量大于0.5ml/kg. h。呼吸支持采用

生理低限的潮气量，同时调整呼吸频率控制PaCO2，这样可以达到血气正常化的目标，并且缩短通气时间改善预后，避免气压伤等等[5]。但是脓毒症的病死率仍居高不下，高达30%～70%。脓毒症治疗花费高，医疗资源消耗大，造成了严重的社会负担，降低了人类的生活质量，对健康形成了巨大威胁[4]。

二、脓毒症血管渗漏的研究现状。

目前研究显示脓毒症致血管渗漏主要发生在微静脉，少见于毛细血管。5-羟色胺、组胺、白三烯、缓激肽、脂多糖和缺血再灌注损伤等都可以导致微静脉通透性增高，血浆渗出和白细胞的游出。现认为血管内皮细胞在微静脉通透性增高过程中发挥重要作用。大分子物质透过微静脉主要有内皮细胞旁途径和穿细胞途径两种通路[7, 8]。

因为内皮间裂隙是血管渗漏的主要途径，内皮间连接及蛋白成为研究的焦点。其中含有内皮细胞间的紧密联接和粘附联接，内皮细胞和基底膜间的粘附联接。构成紧密联接的连接蛋白主要由咬合蛋白(occludin)、闭合蛋白(claudine)、带状闭合蛋白(zona occludens, ZO)、连接粘附分子（junction adhesion molecule，

JAM）等]。它们和连接复合物蛋白(ZO-1、ZO-2、ZO-3、p130、7H6、Symplekin)、细胞骨架结构（微管、中丝、微丝）共同构成紧密连接复合物[1]。

粘附联接是指两个邻近内皮细胞之间20-35nm的间隔，其中主要由钙粘蛋白(cadherin)填充[31]。钙粘蛋白是一个依赖钙离子的胞间粘附分子的家族，血管内皮细胞表达特异的内皮钙粘蛋白(VE-cadherin)[32]。细胞内、外钙离子缺乏，细胞骨架收缩活动，钙粘蛋白的磷酸化和B-连环蛋白的变化都会影响到钙粘蛋白的结构和功能。内皮-基底膜间的粘附是血管内物质穿透出血管的屏障。内皮细胞与基底膜间的粘附主要由整合蛋白及相关的蛋白构成。整合蛋白为内皮细胞表面的受体，可以与细胞外基质中的配基相连接，起到内皮-基底膜之间粘附分子的作用。另外整合蛋白的β亚基胞内区与一系列胞内蛋白质相结合，最后连接细胞骨架的肌动蛋白[1, 2]。

以上各种连接蛋白均通过各种方式与细胞骨架相连，使胞外基质与细胞骨架相作用并形成整体，细胞骨架的任何改变和连接蛋白本身的破坏都可能导致内皮屏障功能的损害和血管通透性的增高。现在认为各种不同原因致使血管通透性增高的共同通路是内皮细胞收缩性的改变。主要是骨架蛋白中的肌动蛋白和肌球蛋

白影响内皮细胞的收缩，且肌动蛋白和肌球蛋白之间的相互作用主要依赖于

MLC的磷酸化状态[2, 7]。

现认为cAMP是内皮细胞屏障功能的主要决定因素[9]，无论在体外还是体内，cAMP都能消除低氧等因素引起的内皮细胞通透性增加。研究发现在低氧条件下，内皮细胞通透性呈时间和浓度依赖性，cAMP水平进行性降低，腺苷酸环化酶的活性也进行性降低，而加入cAMP可以抑制内皮细胞通透性增高[10]。信号与胞膜受体结合后通过鸟苷酸调节蛋白（G蛋白）激活PLC, PLC催化PIP2分解为三磷酸肌醇IP3和DAG。前者介导胞内Ca2+浓度的升高，后者则激活

PKC。三磷酸肌醇促使钙库中的Ca2+释出，胞浆的Ca2+升高，激活PKC，而二酰甘油可直接激活PKC. PKC被激活后，由胞浆转移到胞膜，激活的PKC可使多种蛋白的丝氨酸、苏氨酸发生磷酸化而发挥作用。PKC可以使Rho鸟苷酸解离抑制因子磷酸化，使Rho 激活，调节内皮细胞屏障功能[11]。

内皮细胞内钙库的释放和胞外钙的内流，使胞浆游离钙离子浓度升高，并进一步激活下游的信号通路，引起细胞相应的反应，包括内皮屏障功能的变化。细胞内钙离子浓度的变动对内皮细胞通透性的影响通过两种途径实现：第一，细胞内钙离子与多种细胞骨架和调节蛋白结合，这些蛋白质功能的变化可以直接或间接地改变内皮的通透性[12]。第二，细胞内钙离子浓度的升高能够激活PKC，PKC可以直接磷酸化肌球蛋白轻链(MLC)的丝氨酸/苏氨酸残基，也可以通过激活MLC激酶(MLCK)，引起细胞骨架蛋白MLC磷酸化而导致细胞结构蛋白的重组排列。细胞内Ca2+浓度上升，还可以和钙调蛋白结合形成Ca-CaM复合物，激活MLCK，引起MLC的磷酸化[13]。有实验证明，钙离子升高血管通透性的作用能够经由激活一氧化氮合酶(NOS)，促进一氧化氮(NO)的生成和释放，刺激细胞内可溶性鸟苷酸环化酶(sGC) 催化cGMP的生成，PKG激活。这一过程组成了一条Ca2+→NO

→cGMP→PKG的级联反应通路，从而影响血管的通透性[14]。

在血管内皮细胞中，RhoA通过活化下游的Rho激酶继而使肌球蛋白轻链磷酸化酶(MLCP)的肌球蛋白轻链磷酸酶调节亚单位磷酸化而抑制MLCP的活性，使肌球蛋白轻链(MLC)的去磷酸化作用减弱，导致肌动-肌球蛋白收缩，细胞骨架重组，从而改变血管通透性。研究提示酪氨酸激酶是内皮细胞通透性调节的重要通路之一。如应用酪氨酸磷酸酶抑制剂维持蛋白质酪氨酸磷酸化水平，微血管的通

透性会明显增加。特异性酪氨酸激酶抑制剂可阻断组胺或PMA导致的内皮细胞功能障碍[15]。研究表明，部分MAPK的激活具有整合素依赖性，休克时刺激通过机械传导使整合素与细胞基质蛋白作用，酪氨酸激酶激活，可使内皮细胞MAP激酶活性增加[16]。

综上所述，关于血管内皮细胞通透性增大的机制做了大量研究，发现了许多信号通路和药物作用靶点，但仍尚未完全阐明。以至于目前临床上缺乏对脓毒症或脓毒性休克血管通透性增大的有效治疗措施。

三、内质网应激与疾病。

内质网是真核细胞的重要细胞器，对细胞内部和外部环境的改变是非常敏感的。缺血损伤、氧化应激、钙稳态紊乱均可引起其功能紊乱，当打破了蛋白质合成、成熟和降解之间的平衡，在内质网腔内聚集错误折叠或未折叠蛋白和出现钙平衡紊乱的情况，称为内质网应激。内质网应激ERS（endoplasmic reticulum stress）是细胞在胞内和胞外各种应激因子刺激下做出的一种适应性反应，但太强程度或太长时间的ERS可致使细胞凋亡[17]。

现已知，哺乳动物的内质网应激信号转导形成3条互相联系的通道，通过3个跨膜蛋白IRE1，PERK、ATF6途径介导转录和翻译水平：内质网膜上IRE1α活化后，能特异地剪接XBP-1mRNA，其翻译产物XBP-1能促进内质网靶分子GRP78的基因转录，上调分子伴侣蛋白GRP78等的表达。IRE1-XBP1途径不仅诱导伴侣分子，还通过诱导EDEM来有效应答ERS，EDEM是Ⅱ型内质网跨膜蛋白，它与错构糖蛋白的甘露聚糖-8结合并加强错构蛋白的有效降解。PERK为I型内质网跨膜蛋白，属于elf2α蛋白激酶家族。PERK可通过磷酸化elf2α抑制蛋白质翻译。从而减轻ER的蛋白负荷。ATF6是Ⅱ型内质网跨膜蛋白，ERS时，与Bip分离，转移至高尔基体内，使ATF6活化并被特异蛋白酶裂解运送至细胞核内，从而促进

EREM的转录因子和UPR靶分子基因转录[17, 18]。

目前研究发现内质网应激和多种心血管疾病发生过程相关。如动脉粥样硬化，研究发现同型半胱氨酸能够通过诱导ERS进而促进胆固醇的合成，另外

CHOP、TDAG51的表达与胆固醇的聚集能够引发巨噬细胞的凋亡，致使巨噬细胞碎片堆积在血管壁，形成动脉粥样硬化。内质网应激相关的凋亡可能和缺血再灌导致的细胞死亡有紧密的关系。研究发现内质网应激相关的凋亡能够经由阻碍再

灌注损伤时细胞的钙超载现象，缓解再灌注时的细胞损伤[19]。Okada等通过研究主动脉缩窄引发的大鼠压力负荷过重致心衰模型，发现该模型中存在持续的内质网应激，而且可能促进了心肌细胞凋亡，同时发现在该模型中CHOP途径而非

JNK、caspase12途径被激活[20] 。

以往研究表明，休克会引发血管内皮细胞的内质网应激，休克还会致使血管通透性的增高。据此推测内质网应激可能介入了脓毒性休克血管通透性的调节，但具体机制尚不十分清楚。

四、内质网应激与脓毒症血管渗漏。

当发生轻度ERS时，UPR可通过下调翻译和上调伴侣分子等来维持稳态而保护细胞。但发生持续或过强的ERS时则会诱导细胞的凋亡。已知ERS诱导细胞凋亡的途径主要有CHOP途径, caspase-12途径和, jnk途径。

国内外研究表明，GRP78大概介入了调理IP3R的活性[22]。GRP78可促进

IP3R1四聚体的组装，GRP78和新生成的IP3R1单体相互作用并结合以保证

IP3R1单体的精确组装。内质网应激时，GRP78和IP3R1的相互作用受损导致

IP3R1功能异常，IP3R1通过改变Ca2+信号加速神经细胞死亡。GRP78的表达增强能明显促进IP3R介导的Ca2+释放。以上研究表明，GRP78大概是通过介入调理了IP3R的活性这一过程才具有影响内质网内钙离子的释放的作用[23]。

另外，CHOP蛋白可经由ER氧化酶1α（ERO1-α）活化IP3R从而促使细胞凋亡[24]。而小干扰RNA(siRNA)基因通过抑制ERO1-α从而阻碍细胞凋亡。这说明CHOP蛋白大概也介入调理IP3R的活性，并进而影响了内质网内Ca2+的释放[25]。

内皮细胞内钙库的释放和胞外钙的内流，使胞浆游离钙离子浓度升高，并进一步激活下游的信号通路，引起细胞相应的反应，包括内皮屏障功能的变化。细胞内钙离子浓度的变动对内皮细胞通透性的影响通过两种途径实现：第一，细胞内钙离子与多种细胞骨架和调节蛋白结合，这些蛋白质功能的变化可以直接或间接地改变内皮的通透性[12]。第二，细胞内钙离子浓度的升高能够激活PKC，PKC可以直接磷酸化肌球蛋白轻链(MLC)的丝氨酸/苏氨酸残基，也可以通过激活MLC激酶(MLCK)，引起细胞骨架蛋白MLC磷酸化而导致细胞结构蛋白的重组排列。细胞内Ca2+浓度上升，还可以和钙调蛋白结合形成Ca-CaM复合物，激活MLCK，

引起MLC 的磷酸化[13]。

现认为细胞浆中Ca2+的含量升高会促进肌动蛋白应激纤维的形成，肌动蛋白应激纤维活性的改变可以影响细胞细胞骨架的重构从而影响血管的通透性。脓毒症发生机制复杂，给人类造成了巨大的经济和社会负担，因此明确血管通透性改变的关键因素，从而寻找新的治疗靶点，是今后的努力方向。

参考文献

[1] 赵克森, 黄巧冰. 血管通透性增高的基本机制[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19（4）: 549- 553.

[2] 景炳文. 毛细血管内皮细胞膜结构与血管通透性[J]. 中华损伤与修复杂志. 2013, 8(5): 461-46 3.

[3] 王正国. 当前脓毒症研究的思考[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(11): 841-844.

[4] 马朋林. 认识与挑战: 脓毒症流行病学变化的启示[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(11): 1015-1018.

[5] 牛晓蓉, 顾勤. 脓毒性休克液体复苏的治疗进展[J]. ft东医药. 2013, 53(38): 102-105.

[6] 李小丽, 朱永健. 早期连续性静-静脉血液滤过治疗对脓毒性休克容量复苏的影响[J]. 中华急诊医学杂志. 2012, 21(3): 318-320.

[7] 魏海苓. 脓毒症毛细血管渗漏的研究进展[J]. 感染、炎症、修复, 2013, 14(2): 126-128.

[8] 周昕怡, 方向明. 从宏观到微观—危重症中的微循环障碍及其诊疗进展[J]. 现代实用医学.2 012, 24(2): 123-125.

[9] Gardiner S, March J, Kemp P, Bennett T: Effects of the novel selective endothelin ETA receptor antagonist, SB 234551, on the cardiovascular responses to endotoxemia in con scious rats[J]. Br J Pharmacol, 2001; 133(8): 1371-1377.

[10] Hirata Y, Ishimaru S: Effects of endothelin receptor antagonists on endothelin-1 and i nducible nitric oxide synthase genes in a rat endotoxic shock model[J]. Clin Sci (Lond), 200 2; 103(Suppl 48): 332-335.

[11] Zingarelli B, Day BJ, Crapo JD, et al. The potential role of peroxynitrite in the vascu lar contractile and cellular energetic failure in endotoxic shock[J]. Br J Pharmacol, 1997; 12 0(2): 259-67.

[12] Wu CC, Szabo C, Chen SJ, et al. Activation of soluble guanylyl cyclase by a factor other than nitric oxide or carbon monoxide contributes to the vascular hyporeactivity to v asoconstrictor agents in the aorta of rats treated with endotoxin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994; 201(1): 436-42.

[13] Yang Y, Zhang Y, Liu X, Exogenous taurine attenuates mitochondrial oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in rat cardiomyocytes[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Sh

Anghai). 2013 May;45(5):359-367.

[14] Zhou X, He P. Endothelial [Ca2+] i and caveolin-1 antagonistically regulate eNOS act ivity and microvessel permeability in rat venules[J]. Cardiovasc Res. 2010 Jul 15; 87(2): 340-347.

[15] Stancu CS, Toma L, Sima AV. Dual role of lipoproteins in endothelial cell dysfuncti on in atherosclerosis[J]. Cell Tissue Res. 2012 Aug; 349(2): 433-446.

[16] Zhang C, Kotchoni SO, Samuels AL, et al. SPIKE1 signals originate from and assemb le specialized domains of the endoplasmic reticulum[J]. Curr Biol. 2010 Dec 7; 20(23): 2144-2149.

[17] 李载权, 周爱儒. 内质网应激反应分子机理研究进展[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2 004, 20(3): 283-288.

[18] 刘丽丽, 郭启煜. 未折叠蛋白反应的信号通路[J]. 中国医药生物技术. 2009, 4(6): 455-457.

[19] 陈鹏, 杨成明. 内质网应激反应与心血管系统疾病[J]. 心血管病学进展. 2009, 30(2): 315-319.

[20] Majors AK, Austin RC, Motte CA, et al. Endoplasmic reticulum stress induces hyaluronan deposition and leukocyte adhesion[J]. Biol Chem, 2003, 278(47): 47223-47231.

[21] Ribeiro CM, Boucher RC. Role of endoplasmic reticulum stress in cystic fibrosis-relat ed airway inflammatory responses[J]. Proc Am Thorac Soc. 2010 Nov; 7(6): 387-394.

[22] 林可; 赵连友; 黄金燕; 尚福军; 艾永飞; 胡中伟; 刘沙沙; 高血压大鼠心肌内质网应激时GRP78和CHOP的表达及其与心肌细胞凋亡的关系[J]. 心脏杂志, 2010, 22(6): 828-8 32.

[23] Tjondrokoesoemo A, Li N, Lin PH, et al. Type 1 inositol (1, 4, 5) -trisphosphate receptor activates ryanodine receptor 1 to mediate calcium spark signaling in adult mammalian ske letal muscle[J]. J Biol Chem. 2013 Jan 25; 288(4): 2103-2109.

[24] Monaco G, Beckers M, Ivanova H, et al. Profiling of the Bcl-2/Bcl-X(L) -binding sites on type 1 IP(3) receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Nov 9; 428(1): 31-35.

[25] Xing X, Li Y, Liu H, Wang L, Sun L. Glucose regulated protein 78 (GRP78) is ov erexpressed in colorectal carcinoma and regulates colorectal carcinoma cell growth and apo ptosis[J]. Acta Histochem. 2011 Aug; 95(8): 1151-1156.