

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.17.008

文章编号: 1005-8982(2017)17-0040-05

布加综合征患者腔房转流术后血清 MAPK 相关蛋白的表达及意义*

张晓, 薛焕洲, 王亚东, 余森, 黄今朝
(郑州大学人民医院 肝胆外科, 河南 郑州 450003)

摘要:目的 观察布加综合征(BCS)患者腔房转流术后血清丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)相关蛋白的表达。**方法** 选取腔房转流术后 BCS 患者(观察组)和健康志愿者(对照组),各 40 例。采用 Western blot 检测术前和术后 3 d 及 1 个月血清 MAPK 相关蛋白表达。**结果** ①观察组术前和术后各时间点血清胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)、p38、c-Jun 氨基末端激酶及胞外信号调节激酶 5(ERK5)的表达水平与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),且观察组术前表达水平与术后 3 d 及术后 1 个月比较,差异无统计学意义($P>0.05$);②观察组术前和术后各时间 P-ERK1/2、P-p38 及磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(P-JNK)表达水平均高于对照组, P-ERK5 低于对照组;③观察组术后 3 d 的 P-ERK1/2、P-p38 及 P-JNK 表达水平较术前上升,而 P-ERK5 较术前下降。**结论** 腔房转流术可上调 BCS 患者血清 P-ERK1/2、P-p38 及 P-JNK 的表达水平,下调血清 P-ERK5 的表达水平,而对各总蛋白的表达无调控作用。

关键词: 腔房转流术;布加综合征;MAPK;临床研究

中图分类号: R696.2

文献标识码: A

Expressions of serum MAPK-related proteins in patients with Budd-Chiari syndrome after artificial vascular bypass operation and their clinical significance*

Xiao Zhang, Huan-zhou Xue, Ya-dong Wang, Miao Yu, Jin-zhao Huang
(Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Zhengzhou University,
Zhengzhou, Henan 450003, China)

Abstract: Objective To observe the expressions of related proteins of serum mitogen activated protein kinase (MAPK) in patients with Budd-Chiari syndrome (BCS) after artificial vascular bypass operation and discuss their clinical significance. **Methods** In this study, 40 BCS patients (observation group) and 40 healthy volunteers (control group) were collected. The related proteins of serum MAPK were tested by Western blot before operation, 3 days and 1 month after operation, and compared between the two groups. **Results** The expression levels of serum extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2), P38, JNK and ERK5 in the observation group before operation, 3 days and 1 month after operation were not significantly different from those in the control group ($P>0.05$). In the observation group the expression levels of ERK1/2, P38, JNK and ERK5 before operation were not significantly different from those 3 days or 1 month after operation. Compared to the control group, the expression levels of serum P-ERK1/2, P-P38 and P-JNK were higher, while P-ERK5 was lower in the observation group at each time point ($P<0.05$). In the observation group, the expression levels of serum P-ERK1/2, P-P38 and P-JNK rised, but the P-ERK5 level reduced 3 days after operation compared to the preoperative levels. **Conclusions** Artificial vascular bypass operation can increase the expression levels of serum P-ERK1/2, P-P38 and P-JNK, but reduce serum P-ERK5 expression.

收稿日期:2016-11-17

* 基金项目:河南省医学科技攻关计划重点攻关项目(No:200902006)

[通信作者] 薛焕洲, E-mail: hnsyhzhangxiao@163.com

However, it has no obvious regulatory effect on the total protein expressions.

Keywords: artificial vascular bypass operation; Budd-Chiari syndrome; mitogen activated protein kinase; clinical research

近年来,布加综合征(budd chiari syndrome, BCS)在河南、山东发病率较高,如不能及时接受手术治疗,最终可发展为肝硬化和门脉高压而死于消化道出血和肝功能衰竭^[1-3]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是重要的信号通路调节中枢之一,其信号通路主要由胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK 1/2)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun n-terminal kinase, JNK)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 和胞外信号调节激酶 5(extracellular signal-regulated kinase 5, ERK5)通路 4 大亚族组成,激活后形成不同的转导通路,介导不同的生物学效应。MAPK 信号通路的重要成员可能与 BCS 的发病、发展过程具有高度的关联性^[4]。目前,国内关于 BCS 的相关机制的研究鲜见,本研究通过观察 MAPK 信号通路主要蛋白在 BCS 患者腔房转流术后血清中的表达,探讨 BCS 的可能机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2008 年 11 月 -2013 年 11 月于本院住院接受腔房转流术治疗的 BCS 患者 40 例作为观察组,符合 BCS 的诊断标准,疾病分型 II 型^[5]。其中,男性 23 例,女性 17 例;年龄 30 ~ 50 岁,平均(38.81 ± 6.72) 岁。另选取同期本院体检中心体检健康者 40 例作为对照组。其中,男性 20 例,女性 20 例;年龄 30 ~ 52 岁,平均(38.65 ± 6.50)岁。排除标准:由于其他原因导致的肝、心及肺功能不全者;1994 年版美国纽约心脏病学会心功能分级 IV 级,或补充分级 D 阶段者;肝功能 Child-Pugh 分级为重度损伤者;合并严重原发性疾病,如肝、肾、内分泌及造血系统等疾病并发;过敏体质、哺乳期或妊娠期妇女等对多种药物过敏者;3 个月内参加其他临床试验的患者;精神异常且不配合治疗者;试验过程中,受试者病情出现加重或恶化趋势者;试验过程中受试者主动或被动接受试验规定以外治疗方法者。本研究经过本院伦理委员会审核,患者均签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 主要抗体及仪器

信号调节激酶 1/2 (Phosphorylation extracellular signal-regulated kinase 1/2, P-ERK1/2) 抗体、JNK 抗体、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (Phosphorylation JNK, P-JNK) 抗体、p38 抗体、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (Phosphorylation p38, P-p38) 抗体、ERK5 抗体及磷酸化胞外信号调节激酶 5 (Phosphorylation ERK5, P-ERK5) 抗体均购自美国 Santa cruz 公司。LE-80K 型超速离心机购自美国 Beckman 公司。DYCZ-24F 型电泳仪购自北京六一仪器厂。GE Nova Blot 型转印仪购自美国 GE 公司。

1.2.2 Western blot 检测血清 MAPK 相关蛋白表达

所有患者抽取晨起肘静脉血, 2 500 ~ 3 000 r/min 离心 15 ~ 30 min, 去血浆得固形物, 蒸馏水溶解, 采用醋酸和氯化钠的混合物 (2 : 1 ~ 4 : 1) 进行酸化, 90 ~ 110 °C 下加热 5 ~ 15 min。冷却, 添乙醚, 得蛋白絮状物。采用聚氰基丙烯酸酯正丁酯法测蛋白浓度, 根据定量结果稀释各组样本蛋白总浓度为一致; 将各组样本蛋白与 4 × 十二烷基硫酸钠蛋白上样缓冲液按 3 : 1 体积比例混合, 煮沸 5 min。根据目的蛋白大小, 配置 4.5% 积层凝胶, 10% 的分离凝胶。进行积层凝胶电泳, 前 15 min 16 mA/gel 电泳, 后 32 mA/gel 电泳至底部。电泳后进行电转, 采用恒流转膜 2 h, 电流根据聚偏二氟乙烯膜膜面积大小设置, 计算方法为电流 = 膜面积 (cm²) × 数量 × 0.8 mA。转膜成功后, 放入封闭液, 置于摇床上 37 °C 恒温摇动封闭 1 h。从封闭液中取出后, 洗涤 3 次, 加一抗 (1 : 1 000), 4 °C 孵育过夜, 洗涤 3 次后加二抗, 摇床上 37 °C 恒温摇动孵育 1 h 后, 洗去二抗。采用 Image Tool 3.0 软件分析各条带光密度值, 内参用 β - 肌动蛋白表示, 蛋白的相对表达量用目的蛋白条带 (光密度值) / β - 肌动蛋白 (光密度值) 来反映。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 ERK1/2 和 P-ERK1/2 表达的比较

观察组术前 ERK1/2 表达水平与对照组比较,

差异无统计学意义($t=-0.762, P=0.441$), 观察组术前 P-ERK1/2 表达水平与对照组比较, 差异有统计学意义($t=-21.700, P=0.000$); 观察组术后 3 d 的 ERK1/2 表达水平与对照组比较, 差异无统计学意义($t=-1.476, P=0.140$), 观察组术后 3 d 的 P-ERK1/2 表达水平与对照组比较, 差异有统计学意义($t=26.900, P=0.000$); 观察组术后 1 个月的 ERK1/2 表达水平与对照组比较, 差异无统计学意义($t=-1.381, P=0.166$), 观察组术后 1 个月 P-ERK1/2 表达水平与对照组比较, 差异有统计学意义($t=20.633, P=0.000$), 观察组均高于对照组。观察组术后 3 d 的 ERK1/2 表达水平与术前比较, 差异无统计学意义($t=-0.714, P=0.470$), 观察组术后 3 d 的 ERK1/2 水平与术前比较, 差异有统计学意义($t=5.200, P=0.000$); 观察组术后 1 个月的 ERK1/2 表达水平与术前比较, 差异无统计学意义($t=-0.619, P=0.531$), 观察组术后 1 个月的 ERK1/2 水平与术前比较, 差异无统计学意义($t=-1.067, P=0.289$)。见表 1 和图 1。

2.2 两组血清 p38 和 P-p38 表达水平的比较

观察组术前血清 p38 表达水平与对照组比较, 差异无统计学意义($t=2.333, P=0.076$), 观察组术前血清 P-p38 表达水平与对照组比较, 差异有统计学意义($t=8.897, P=0.000$); 观察组术后 3 d 血清 p38 表达水平与对照组比较, 差异无统计学意义($t=1.767, P=0.055$), 观察组术后 3 d 血清 P-p38 表达水平与对照组比较, 差异有统计学意义($t=19.923, P=0.000$); 观察组术后 1 个月血清 p38 表达水平与对照组比较, 差异无统计学意义($t=0.667, P=0.553$), 观察组术后 1 个月血清 P-p38 表达水平与对照组比较, 差异有统计学意义($t=9.220, P=0.000$); 观察组术后 3 d 血清 p38 表达水平与术前比较, 差异无统计学意义($t=-0.333, P=0.630$), 观察组术后 3 d 血清 P-p38 表达水平与术前比较, 差异有统计学意义($t=11.025, P=0.000$); 观察组术后 1 个月血清 p38 表达水平与术前比较, 差异无统计学意义($t=-1.667, P=0.070$), 观察组术后 1 个月血清 P-p38 表达水平与术前比较, 差异无统计学意义($t=0.322, P=0.749$)。见表 2 和图 2。

2.3 两组血清 JNK 和 P-JNK 表达水平的比较

观察组术前血清 JNK 表达水平与对照组比较, 差异无统计学意义($t=2.500, P=0.062$), 观察组术前血清 P-JNK 表达水平与对照组比较, 差异有统计学意义($t=9.493, P=0.000$); 观察组术后 3 d 血清 JNK

表达水平与对照组比较, 差异无统计学意义($t=0.500, P=0.571$), 观察组术后 3 d 血清 P-JNK 表达水平与

表 1 两组血清 ERK1/2 和 P-ERK1/2 表达的比较

($n=40$)

组别	男/女/例	ERK1/2/($\bar{x} \pm s$)	P-ERK1/2/($\bar{x} \pm s$)
对照组	20/20	0.494 ± 0.056	0.483 ± 0.041
观察组			
术前	23/17	0.478 ± 0.039	1.134 ± 0.084 ¹⁾
术后 3 d	23/17	0.463 ± 0.037	1.290 ± 0.079 ¹⁾²⁾
术后 1 个月	23/17	0.465 ± 0.046	1.102 ± 0.051 ¹⁾
F 值		0.971	4.850
P 值		0.417	0.009

注:1)与对照组比较, $P<0.05$; 2)与术前比较, $P<0.05$

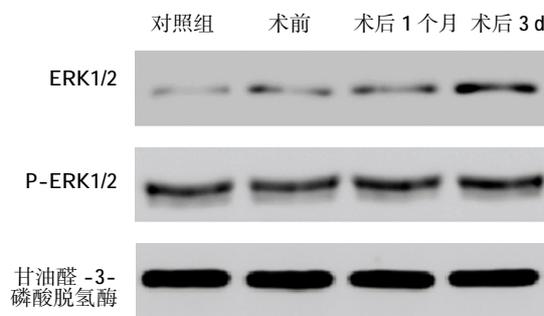


图 1 两组血清 ERK1/2 和 P-ERK1/2 表达的比较

表 2 两组血清 p38 和 P-p38 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p38	P-p38
对照组	0.079 ± 0.007	0.367 ± 0.033
观察组		
术前	0.085 ± 0.005	0.505 ± 0.035 ¹⁾
术后 3 d	0.084 ± 0.007	0.676 ± 0.028 ¹⁾²⁾
术后 1 个月	0.080 ± 0.051	0.510 ± 0.041 ¹⁾
F 值	2.670	132.884
P 值	0.062	0.000

注:1)与对照组比较, $P<0.05$; 2)与术前比较, $P<0.05$

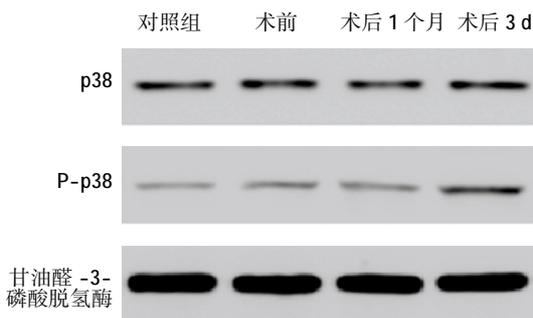


图 2 两组血清 p38 和 P-p38 表达水平的比较

对照组比较,差异有统计学意义($t=24.375, P=0.000$);观察组术后 1 个月血清 JNK 表达水平与对照组比较,差异无统计学意义($t=2.000, P=0.095$),观察组术后 1 个月血清 P-JNK 表达水平与对照组比较,差异有统计学意义($t=7.761, P=0.000$);观察组术后 3 d 血清 JNK 表达水平与术前比较,差异无统计学意义($t=-1.630, P=0.112$),观察组术后 3 d 血清 P-JNK 表达水平与术前比较,差异有统计学意义($t=14.881, P=0.000$);观察组术后 1 个月血清 JNK 表达水平与术前比较,差异无统计学意义($t=-0.485, P=0.260$),观察组术后 1 个月血清 P-JNK 表达水平与术前比较,差异无统计学意义($t=-1.732, P=0.092$)。见表 3 和图 3。

表 3 两组血清 JNK 和 P-JNK 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	JNK	P-JNK
对照组	0.061 ± 0.003	0.483 ± 0.028
观察组		
术前	0.066 ± 0.005	0.631 ± 0.038 ¹⁾
术后 3 d	0.062 ± 0.006	0.863 ± 0.036 ¹⁾²⁾
术后 1 个月	0.064 ± 0.006	0.604 ± 0.036 ¹⁾
F 值	2.053	207.483
P 值	0.124	0.000

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$; 2)与术前比较, $P < 0.05$

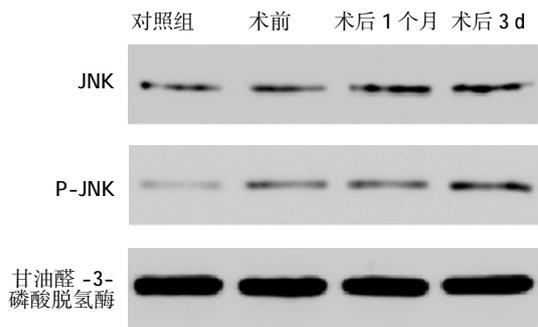


图 3 两组血清 JNK 和 P-JNK 表达水平的比较

2.4 两组血清 ERK5 和 P-ERK5 表达水平的比较

观察组术前血清 ERK5 表达水平与对照组比较,差异无统计学意义($t=0.220, P=0.827$),观察组术前血清 P-ERK5 表达水平与对照组比较,差异有统计学意义($t=-5.774, P=0.000$);观察组术后 3 d 血清 ERK5 表达水平与对照组比较,差异无统计学意义($t=0.220, P=0.827$),观察组术后 3 d 血清 P-ERK5 表达水平与对照组比较,差异有统计学意义($t=-9.193, P=0.000$);观察组术后 1 个月血清 ERK5 表达水平与对照组比较,差异无统计学意义($t=-2.070, P=$

0.116),观察组术后 1 个月血清 P-ERK5 表达水平与对照组比较,差异有统计学意义($t=-5.315, P=0.000$);观察组术后 3 d 血清 P-ERK5 表达水平与术前比较,差异有统计学意义($t=-3.419, P=0.002$);观察组术后 1 个月血清 ERK5 表达水平与术前比较,差异无统计学意义($t=-2.290, P=0.139$),观察组术后 1 个月血清 P-ERK5 表达水平与术前比较,差异无统计学意义($t=0.460, P=0.649$)。见表 4 和图 4。

表 4 两组血清 ERK5 和 P-ERK 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ERK5	P-ERK5
对照组	0.059 ± 0.006	0.785 ± 0.028
观察组		
术前	0.060 ± 0.005	0.584 ± 0.072 ¹⁾
术后 3 d	0.060 ± 0.005	0.465 ± 0.114 ¹⁾²⁾
术后 1 个月	0.054 ± 0.004	0.600 ± 0.072 ¹⁾
F 值	2.670	28.835
P 值	0.062	0.000

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$; 2)与术前比较, $P < 0.05$

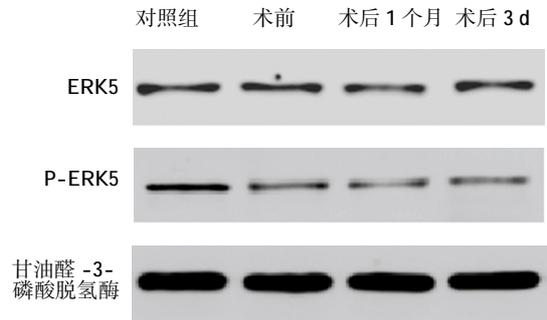


图 4 两组血清 ERK5 和 P-ERK5 表达水平的比较

3 讨论

MAPK 可调控细胞内多种信号通路,其主要是通过蛋白修饰调控下游元件来参与细胞增殖、分化及凋亡等环节。腔房转流术是目前治疗 BCS 常用的外科手术方法之一,是一种通过促进侧支循环建立的间接减压手术。腔房转流术可能对 MAPK 信号通路产生影响^[6]。本研究发现,观察组术前和术后各时间血清 ERK1/2、p38、JNK 及 ERK5 的表达水平与对照组比较无差异,且观察组术前表达水平与术后 3 d 与术后 1 个月比较无差异,提示 MAPK 的 4 大亚族的总蛋白在 BCS 患者血清中的表达在术前、术后未见变化,即上述 4 大亚族的功能并非由其总蛋白的表达变化来实现的。

进一步观察发现,观察组术前和术后各时间 P-

ERK1/2、P-p38 及 P-JNK 表达水平均高于对照组, P-ERK5 表达水平低于对照组,且观察组术后 3 d P-ERK1/2、P-p38 及 P-JNK 表达水平较术前上升,而 P-ERK5 较术前下降,说明 4 大亚族的功能主要通过其蛋白磷酸化来体现。其中,ERK1/2、p38 及 JNK 蛋白磷酸化的表达程度随着病情的进展而升高,随着病情的缓解而降低,ERK5 蛋白磷酸化的表达则恰好呈现相反的趋势,其表达程度随着病情的进展而降低,随着病情的缓解而升高。由此可见,MAPK 信号通路蛋白磷酸化的表达与 BCS 密切相关。MPKA 信号通路相关蛋白的表达与肝、心及肺功能的改变具有相关性^[7-10]。运用腔房转流术治疗 BCS,虽然术后早期因手术麻醉、创伤和机体应激反应等因素导致短期内肝功能恶化、短时间内回心血量增大引起不同程度的心功能不全,急性肺损伤导致肺功能的恶化,但是由于术后肝静脉狭窄解除,配合术前保肝,术后利尿等积极治疗和机体的自身调整,患者的心、肺及肝可以慢慢适应术后的负荷,在术后 1 个月逐渐恢复至正常水平,MPKA 信号通路相关蛋白的水平也随之降低。

综上所述,腔房转流术治疗后可以上调 BCS 患者血清 P-ERK1/2、P-p38 及 P-JNK 的表达水平,下调血清 P-ERK5 的表达水平,而对各总蛋白的表达无调控作用,该结果可能为腔房转流术治疗 BCS 的作用机制提供新的思路。但是本研究仍有一定的局限性:由于观察周期短、病例收集样本数较少等问题,缺少对 p38、ERK1/2、JNK、ERK5 等信号通路中特异性抑制剂及其下游调控元件的系统分析,后期仍需

对机制做进一步探讨。

参 考 文 献:

- [1] 雒红涛, 薛焕洲. 布加综合征的临床诊疗进展[J]. 中国实用医刊, 2014, 41(8): 88-89.
- [2] ZAJKO A B, CLAUS D, CLAPUYT P, et al. Obstruction to hepatic venous drainage after liver transplantation: treatment with balloon angioplasty[J]. Radiology, 2015, 170(3): 763-765.
- [3] TASSE J, BERGE M, PIERCE K, et al. Safe and effective treatment of early suprahepatic inferior vena caval outflow compromise following orthotopic liver transplantation using percutaneous transluminal angioplasty and stent placement[J]. Angiology, 2014, 62(1): 46-48.
- [4] 陈建勇, 王聪, 王娟, 等. MAPK 信号通路研究进展[J]. 中国医药科学, 2011, 1(8): 32-34.
- [5] 彭建国. 彩色多普勒超声在布加综合征诊断中的价值[J]. 中外医疗, 2010, 29(5): 19-20.
- [6] PETI W, PAGE R. Molecular basis of MAP kinase regulation[J]. Protein Sci, 2013, 22(12): 1698-1710.
- [7] 鄢琦. MAPK 信号转导通路在风湿性心脏病瓣膜组织中的表达及意义[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.
- [8] YANG K, QIU BY, YAN J, et al. Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway ameliorates delayed gastric emptying in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 23(2): 696-700.
- [9] XIAO L, HAACK K K, ZUCKER I H. Angiotensin II regulates ACE and ACE2 in neurons through p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2013, 304(11): C1073-C1079.
- [10] WANG Q, CUI W, ZHANG H L, et al. Atorvastatin suppresses aldosterone-induced neonatal rat cardiac fibroblast proliferation by inhibiting ERK1/2 in the genomic pathway[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2013, 61(6): 520-527.

(李科 编辑)