

细胞外信号调节激酶在应激性溃疡发病中的作用

满晓华,李兆申*,高 军,龚燕芳,吴红玉,金 晶(第二军医大学长海医院消化内科,上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2,ERK1/2)在实验性应激性溃疡发病中的作用。**方法:**采用浸水束缚(water-immersion restraint,WIR)应激实验复制大鼠应激性溃疡模型。检测 WIR 应激 5 min、15 min、30 min、1 h、2 h 和 3.5 h 各时间点的胃黏膜 ERK1/2 活化情况,并观察特异性 ERK1/2 抑制剂 PD98059 预处理(1 mg/kg, iv.)对胃黏膜损伤的影响。采用 Western 印迹检测 ERK1/2 和 caspase-3 表达,激酶活性分析方法检测 ERK1/2 活性,电泳迁移率变动分析(EMSA)检测转录因子活化蛋白 1(AP-1)和核因子 κ B(NF- κ B)DNA 结合活性,Northern 印迹检测 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达,采用溃疡指数(UI)计分和病理学检查评价胃黏膜病变程度,TUNEL 技术检测和定量细胞凋亡。**结果:**正常大鼠胃黏膜仅检测到极微弱的磷酸化 ERK1/2 表达,WIR 应激 15 min 后胃黏膜 ERK1/2 即发生活化并于 3.5 h 后达到峰值。PD98059 抑制 ERK 活化后,胃黏膜 AP-1 和 NF- κ B 活性及 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达显著下调,胃黏膜损伤程度也明显减轻,同时伴有胃黏膜 caspase-3 活化和凋亡轻度增加。**结论:**ERK1/2 活化在浸水束缚应激诱导的胃黏膜损伤中发挥了重要作用。

[关键词] 应激;溃疡;细胞外信号调节激酶

[中图分类号] R 573.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)05-0508-04

Role of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in pathogenesis of stress-induced gastric ulcer

MAN Xiao-hua, LI Zhao-shen*, GAO Jun, GONG Yan-fang, WU Hong-yu, JIN Jing (Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the role of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signal pathway in the pathogenesis of stress-induced gastric ulcer. **Methods:** Animal model of stress-induced gastric ulcer was established in rats with water-immersion restraint (WIR) stress. The mucosal activation of ERK1/2 was observed before and 5, 15 and 30 min, and 1, 2 and 3.5 h after WIR stress. Some animals were also treated with an intravenous injection of PD98059 (1 mg/kg), a specific ERK1/2 inhibitor, 1 h prior to WIR stress. Expression of total ERK1/2 and caspase-3 were detected by Western blot analysis; ERK1/2 activity was measured by kinase activity assay using myelin basic protein as a specific substrate. DNA-binding activities of the transcription factors activator protein-1 (AP-1) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) were determined by electrophoretic mobility shift assays (EMSA). Mucosal TNF- α and IL-1 β mRNA expression was analyzed by Northern blot analysis. The degrees of the gastric mucosal lesions were expressed as ulcer index (UI) and pathological evaluation. Apoptosis in the gastric mucosa was examined by an *in situ* TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) method. **Results:** Activated ERK1/2 was very weakly expressed in the gastric mucosa of normal rats. ERK1/2 was rapidly activated in the gastric mucosa of rats 15 min after WIR stress and the activity reached the maximal after 3.5 h. Pretreatment with PD98059 significantly inhibited ERK1/2 activation, decreased AP-1 and NF- κ B activities and TNF- α and IL-1 β mRNA expression, and obviously relieved gastric mucosal lesions, accompanied by caspase-3 activation and increased apoptosis. **Conclusion:** The present results indicate that ERK1/2 activation plays an important role in the development of stress-induced gastric ulcer.

[KEY WORDS] stress; ulcer; extracellular regulated kinase 1/2

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(5): 508-511]

应激性溃疡是各种应激情况引起的以胃黏膜充血、水肿、糜烂和出血等为主的急性胃黏膜病变,常见于休克、严重创伤、大手术、烧伤、全身严重感染等危重患者,具有较高的病死率^[1]。近 20 年来随着抑酸药物的广泛使用,临床上应激性溃疡的发病率虽然有明显下降,但其防治效果仍有待进一步提高,因此阐明其发病的分子机制具有潜在的临床意义。细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular regulated kinase 1/2, ERK1/2)信号转导通路在调控机体应激、

炎症反应和细胞增殖及凋亡等过程中起到了重要作用^[2],本研究通过复制经典的浸水-束缚(water-immersion restraint, WIR)应激性溃疡大鼠模型,观察了大鼠胃黏膜 ERK1/2 动态活化情况,并探讨了 ERK1/2 活化在胃黏膜炎症反应、溃疡和细胞凋亡中的作用,以初步了解其在实验性应激性溃疡发病

[作者简介] 满晓华,技师. E-mail: xiaohua7378@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: zhsl@81890.net

中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物 雄性SD大鼠,清洁级,周龄8周,体质量200~210 g,购于第二军医大学实验动物中心。大鼠适应性饲养1周后用于本实验。

1.2 主要试剂 ERK1/2 特异性抑制剂 PD98059 购于 Calbiochem 公司;小鼠抗 phospho-ERK1/2 单抗、兔抗 pan-ERK1/2 多抗、ERK1/2 激酶分析试剂盒和兔抗 caspase-3 多抗购于 Cell Signaling Technology 公司;BCA 蛋白定量试剂盒为 Pierce 公司产品;[α -³²P]ATP、[α -³²P]dCTP、ECL 试剂盒、DNA 随机引物标记试剂盒 (Megaprime DNA labeling system)。核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 和活化蛋白 1 (activator protein-1, AP-1) 启动子结合位点寡核苷酸、电泳迁移率变动分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 试剂盒 (Gel shift assay system) 为 Promega 公司产品;TUNEL 试剂盒为 Roche Diagnostics 产品。

1.3 大鼠应激性溃疡模型复制 采用 WIR 应激复制大鼠应激性溃疡模型。大鼠禁食但不禁水 48 h 后,经乙醚轻度麻醉,束缚于木板上,垂直浸于 23℃ 水中,水面平胸骨剑突。

1.4 动物分组 60 只大鼠随机分成 4 组:正常对照组(10 只)、WIR 应激模型组(30 只)、PD98059 处理组(10 只)和处理对照组(10 只)。正常对照组不予 WIR 应激及药物干预,PD98059 处理组于 WIR 应激前 1 h 尾静脉注射 1 mg/kg 的 PD98059,对照组动物在应激前注射等体积对照溶剂。WIR 应激模型组动物在浸入水中 5 min、10 min、30 min、1 h、2 h 和 3.5 h 后各处死 5 只动物,迅速将胃取出置冰上,沿胃大弯剪开,冰冷生理盐水冲洗后,用灭菌载玻片将胃体黏膜刮下,置液氮中冻存。

1.5 胃黏膜损伤评价 大鼠胃经 10% 中性甲醛固定 24 h 后,于 10 倍放大镜下对溃疡指数 (ulcer in-

dex, UI) 进行评分:斑点糜烂计 1 分;溃疡长度 < 1 mm 计 2 分;1~2 mm 计 3 分;2~3 mm 计 4 分;> 3 mm 计 5 分;宽度 > 1 mm 时分值 × 2。另取部分胃黏膜行常规病理学检查。

1.6 胃黏膜胞质蛋白和核蛋白提取 按我们以前的方法进行^[3]。蛋白浓度采用 BCA 法定量,以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准品。标本置 -70℃ 冻存待测。

1.7 Western 印迹分析 按我们以前的方法进行^[3]。采用 Fluor-S-MultiImager 扫描条带并用 4.1 版本 Quantity one 软件 (Bio-Rad) 分析各条带面积灰度值。pan-ERK1/2 水平为内参照。

1.8 ERK1/2 激酶活性分析 按试剂盒说明书进行。ERK1/2 底物 MBP 的磷酸化水平采用 Western 印迹检测。

1.9 EMSA 按我们以前的方法^[3]进行。采用 EMSA 实验检测胃黏膜组织核提取物中 NF- κ B 和 AP-1 的 DNA 结合活性。

1.10 胃黏膜组织总 RNA 提取与 Northern 印迹分析 按我们以前的方法^[4]进行。

1.11 胃黏膜细胞凋亡检测 按我们以前的方法^[5]进行。TUNEL 法检测细胞凋亡,应用图像分析系统进行定量灰度扫描。

1.12 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析 (ANOVA) 或 *t* 检验比较组间差异,所有统计分析均经 SPSS 11.0 软件处理完成。

2 结果

2.1 应激性溃疡大鼠胃黏膜 ERK1/2 活化的动态变化 正常对照大鼠胃黏膜仅检测到极微弱的磷酸化 ERK1/2 表达,WIR 应激 15 min 后 ERK1/2 即明显活化,为正常水平的 (2.1 ± 0.4) 倍 ($n=5, P < 0.05$); 3.5 h 后 ERK1/2 活化达到最大值,为正常水平的 (7.6 ± 1.5) 倍 ($n=5, P < 0.01$),总 ERK1/2 水平在 WIR 应激期间无明显变化,见图 1。

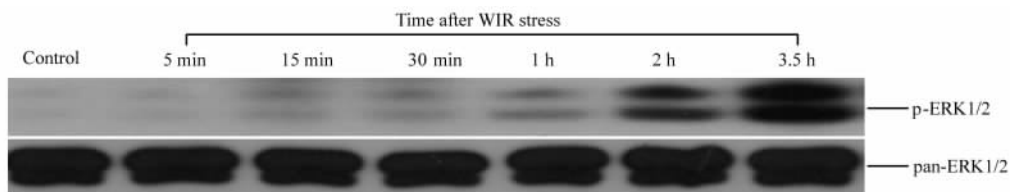


图 1 WIR 应激大鼠胃黏膜 ERK1/2 活化的动态变化 (Western 印迹)

Fig 1 Temporal activation of ERK1/2 in gastric mucosa in WIR stress rats (Western blot)

2.2 PD98059 对应激性溃疡大鼠胃黏膜 ERK1/2 活化的影响 Western 印迹结果表明,在 WIR 应激前

1 h 静脉注射 1 mg/kg PD98059 后,应激 3.5 h 后胃黏膜磷酸化 ERK1/2 水平较 WIR 应激对照组下降

(74±10)%(n=5, P<0.01), 激酶活性分析结果证实 ERK1/2 活性下降(92±13)%(n=5, P<0.01), 见图 2。

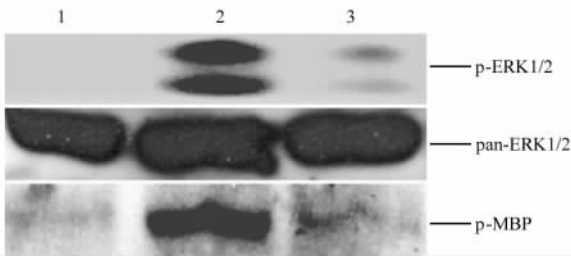


图 2 PD98059 对 WIR 应激大鼠胃黏膜 ERK1/2 活化的影响 (Western 印迹和激酶活性分析)

Fig 2 Effects of PD98059 on ERK1/2 activation in gastric mucosa in WIR stress rats (Western blot and kinase activity analysis)

1: Control; 2: WIR stress; 3: WIR stress+PD98059

2.3 PD98059 对应激性溃疡大鼠胃黏膜 AP-1 和 NF-κB 活化的影响 EMSA 实验结果表明 WIR 应激 3.5 h 后, PD98059 处理组大鼠胃黏膜 AP-1 和 NF-κB 活性分别较对照组下降(65±15)%和(77±11)%(n=5, P 值均<0.01), 见图 3。

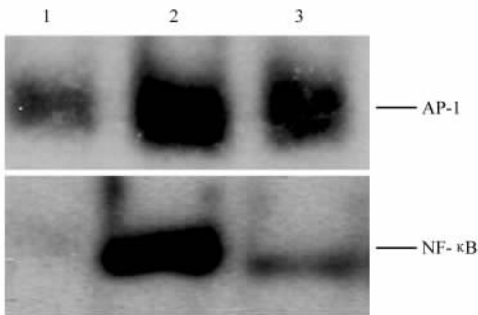


图 3 PD98059 对 WIR 应激大鼠胃黏膜 AP-1 和 NF-κB 活化的影响 (EMSA)

Fig 3 Effects of PD98059 on AP-1 and NF-κB activation in gastric mucosa in WIR stress rats (EMSA)

1: Control; 2: WIR stress; 3: WIR stress+PD98059

2.4 PD98059 对应激性溃疡大鼠胃黏膜促炎性细胞因子基因表达的影响 Northern 印迹检测结果表明正常大鼠胃黏膜存在较高水平的 TNF-α 和 IL-1β mRNA 表达。WIR 应激 3.5 h 后 TNF-α 和 IL-1β mRNA 表达显著增加, 分别为正常对照组的(16±4)倍和(25±6)倍。PD98059 处理组大鼠胃黏膜 TNF-α 和 IL-1β mRNA 水平较 WIR 应激对照组分别下降(86±9)%和(78±7)%(n=5, P 值均<0.01), 见图 4。

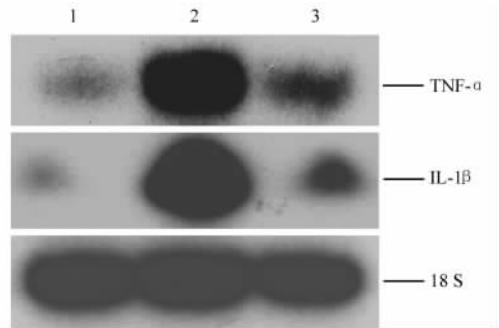


图 4 PD98059 对 WIR 应激大鼠胃黏膜 TNF-α 和 IL-1β 基因表达的影响 (Northern 印迹)

Fig 4 Effects of PD98059 on TNF-α and IL-1β gene expression in gastric mucosa in WIR stress rats (Northern blot)

1: Control; 2: WIR stress; 3: WIR stress+PD98059

2.5 PD98059 对应激性溃疡大鼠胃黏膜损伤的影响 大鼠禁食 24 h 后胃黏膜未见明显异常, WIR 应激 3.5 h 后大鼠胃黏膜存在明显病变, 表现为弥漫性充血水肿, 腺上皮部分坏死脱落, 胃体广泛分布有点、线状溃疡, 而 PD98059 处理组大鼠胃黏膜溃疡面和出血点明显减少, 仅见散在分布, 见图 5。大鼠胃黏膜病变参数计分结果表明, PD98059 处理组大鼠 UI 显著低于 WIR 应激对照组 [(5.3±0.5) vs (33.0±5.5), n=5, P<0.01]。



图 5 PD98059 对 WIR 应激大鼠胃黏膜损伤的影响

Fig 5 Effects of PD98059 on gastric mucosal lesions in WIR stress rats (H-E, ×40)

1: Control; 2: WIR stress; 3: WIR stress+PD98059

2.6 PD98059 对应激性溃疡大鼠胃黏膜细胞凋亡和 caspase-3 活化的影响 TUNEL 染色图像分析结果表明,正常对照组大鼠胃黏膜上皮散在染色阳性细胞,单位面积内平均像素点为 $1\ 280 \pm 196$ ($n=5$),WIR 应激 3.5 h 时阳性细胞数显著增加,平均像素点达 $24\ 520 \pm 3\ 736$ ($n=5$),显著高于对照组 ($P < 0.01$),而 PD98059 处理组凋亡细胞数增加为 $36\ 550 \pm 4\ 530$ ($n=5$),显著高于 WIR 应激对照组 ($P < 0.05$)。Western 印迹结果表明正常大鼠胃黏膜检测不到活性 caspase-3 蛋白(相对分子质量为 17 000)表达,WIR 应激 3.5 h 后 caspase-3 发生降解,活性 caspase-3 表达增加,而无活性 caspase-3(相对分子质量为 32 000)水平则相应下降;PD98059 处理组大鼠胃黏膜活性 caspase-3 水平为 WIR 应激对照组的 (1.7 ± 0.2) 倍 ($n=5$, $P < 0.05$),其增加程度与凋亡细胞数增加基本一致,见图 6。

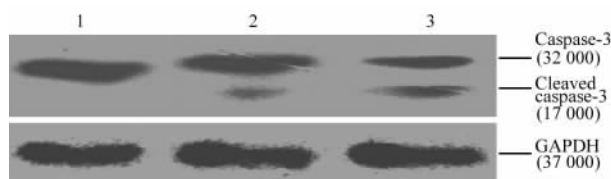


图 6 PD98059 对 WIR 应激大鼠胃黏膜 caspase-3 活化的影响 (Western 印迹)

Fig 6 Effects of PD98059 on caspase-3 activation in gastric mucosa in WIR stress rat (Western blot)

1:Control;2: WIR stress;3: WIR stress+PD98059

3 讨论

本实验结果显示应激过程中胃黏膜总 ERK1/2 水平无明显变化,应激 15 min 后胃黏膜磷酸化 ERK1/2 水平开始明显增加,3.5 h 时达到最大值,激酶活性分析结果也证实 ERK1/2 活性明显增加。为进一步证实 ERK1/2 活化是否参与了胃黏膜损伤的发生,本研究观察了 PD98059 对胃黏膜病变程度的影响。PD98059 为 ERK1/2 上游激酶 MEK1/2 的特异性抑制剂,通过阻断 MEK1/2 激活而抑制 ERK1/2 磷酸化。研究发现在 WIR 应激前 1 h 静脉注射 1 mg/kg 的 PD98059 可有效抑制 WIR 应激大鼠胃黏膜 ERK1/2 磷酸化和 ERK1/2 活性,同时胃黏膜损伤和坏死也明显减轻,这证实 ERK1/2 同 p38 MAPK 一样,在应激性溃疡的发生中也有着重要作用。

本研究结果显示应激时伴随着 ERK1/2 活化,胃黏膜 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达水平也显著升

高,而抑制 ERK1/2 活化后其水平明显下降,并且 AP-1 和 NF- κ B 活性也显著下调。结果提示 WIR 应激时胃黏膜 ERK1/2 活化是诱导 AP-1 和 NF- κ B 活化及其下游促炎性细胞因子表达的重要调控因素,这可能是应激性溃疡时胃黏膜炎症反应发生的机制之一。传统观点认为胃黏膜上皮细胞坏死是应激性溃疡时胃黏膜损伤的主要机制,但也有学者^[6]认为脂质过氧化和炎症反应等引起的胃黏膜上皮细胞凋亡也是一重要因素。由于 ERK1/2、AP-1 和 NF- κ B 均是调控细胞增殖和凋亡的重要信号转导通路,本研究也观察了抑制 ERK1/2 活化对胃黏膜细胞凋亡的影响。结果发现 PD98059 预处理可导致 WIR 应激大鼠胃黏膜细胞凋亡数目轻度增加,同时 caspase-3 活化也同比增加,这证实抑制 ERK1/2 活化具有诱导胃黏膜细胞凋亡的作用,这可能与其下游信号 AP-1 和 NF- κ B 活化同时受抑制有关。然而,我们上面结果也证实 ERK1/2 活化参与了胃黏膜损伤。这一矛盾结果一方面提示细胞凋亡在应激性溃疡的发病中的作用可能并不重要,另一方面也提示适度诱导胃黏膜上皮细胞凋亡可能有助于黏膜修复过程,是一有利因素。事实上,细胞坏死是应激性时胃黏膜损伤的主要病理学特征,尽管也伴有上皮细胞凋亡,但凋亡主要见于应激停止后的胃黏膜损伤修复期。

总之,本研究初步证实 ERK1/2 活化在实验性应激性溃疡的发生中发挥了重要作用,进一步研究其活化机制及其作用机制对于探索应激性溃疡的防治新途径具有潜在的指导意义。

[参考文献]

- [1] 黄廷庭. 多器官功能障碍与应激性溃疡[J]. 消化外科, 2002, 1: 305-306.
- [2] Kyriakis J M, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation[J]. *Physiol Rev*, 2001, 81: 807-869.
- [3] 满晓华, 李兆申, 屠振兴, 等. 大黄素对急性胰腺炎大鼠核因子- κ B 活化的影响[J]. *中华消化杂志*, 2005, 25: 586-589.
- [4] 贾一韬, 龚燕芳, 高峻, 等. 人、鼠胰星状细胞 3 种细胞标志物 desmin、GFAP、 α -SMA 的表达[J]. *解放军医学杂志*, 2005, 30: 607-610.
- [5] 刘婧, 李兆申, 许国铭, 等. 细胞凋亡和增殖在大鼠应激性溃疡发病中的作用[J]. *中华消化杂志*, 2003, 23: 595-598.
- [6] Konturek P C, Brzozowski T, Konturek S J, et al. Apoptosis in gastric mucosa with stress-induced gastric ulcers[J]. *J Physiol Pharmacol*, 1999, 50: 211-225.

[收稿日期] 2006-09-12

[修回日期] 2007-01-09

[本文编辑] 曹静