

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00140

## 小鼠小肠缺血再灌注损伤早期 JNK 磷酸化的作用

郑德义<sup>1,2</sup>, 王建国<sup>1,2</sup>, 贾一韬<sup>1</sup>, 付晋凤<sup>2</sup>, 吕开阳<sup>1</sup>, 郑兴锋<sup>1</sup>, 夏照帆<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学长海医院烧伤科, 上海 200433

2. 昆明医学院第二附属医院烧伤科, 昆明 650101

**[摘要]** **目的** 探讨 c-Jun 氨基端激酶(JNK)活化及其介导凋亡信号通路在小鼠小肠缺血再灌注损伤中的作用。**方法** C57 BL/6小鼠随机分为假手术组(S)和缺血再灌注不同时间[即刻(0)、0.5、1、4、6、12 h]组, 夹闭肠系膜前动脉 40 min 后再灌注造成小肠缺血再灌注损伤模型, 假手术组不夹闭动脉。假手术后及再灌注后不同时间处死小鼠取小肠标本, Western 印迹法检测小肠 JNK、磷酸化 JNK、Cleaved-caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平, 观察回肠组织病理学改变。**结果** 肠缺血再灌注早期肠组织病理损伤最重, 至 12 h 肠组织结构基本恢复正常。肠缺血及再灌注早期, 小肠组织 JNK 持续活化, 与假手术组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 与假手术组比较, 再灌注 0.5、1 h 小肠组织 Cleaved-caspase-3 明显增加( $P < 0.01$ ), 同时抗凋亡 Bcl-2 蛋白明显下调( $P < 0.01$ ), 各组间促凋亡蛋白 Bax 表达无统计学差异。**结论** 肠缺血再灌注早期小肠组织 JNK 活化、抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调, 可能参与了 caspase-3 依赖的细胞凋亡和组织损害。

**[关键词]** 小肠; 再灌注损伤; 细胞凋亡; c-Jun 氨基端激酶; 半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3

**[中图分类号]** R 656.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)02-0140-04

### Role of JNK phosphorylation in intestinal ischemia/reperfusion injury in mice

ZHENG De-yi<sup>1,2</sup>, WNAG Jian-ming<sup>1,2</sup>, JIA Yi-tao<sup>1</sup>, FU Jin-feng<sup>2</sup>, LÜ Kai-yang<sup>1</sup>, ZHENG Xing-feng<sup>1</sup>, XIA Zhao-fan<sup>1\*</sup>

1. Department of Burns, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Burns, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650101, Yunnan, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the role of c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase (JNK) activation and JNK-mediated apoptotic signal pathway in intestinal ischemia/reperfusion (II/R) in mice. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into sham-operated group ( $n=6$ ) and II/R groups ( $n=36$ ); the latter was further divided according to time after perfusion (0, 0.5, 1, 4, 6 and 12 h). Animal II/R model was established by clamping the superior mesenteric artery (SMA) for 40 min followed by reperfusion. Animals in the sham-operated group received no clamping. Animals in the two groups were sacrificed at defined time points, and the expression of JNK, phosphorylation (phospho-) JNK, cleaved caspase-3, Bcl-2 and Bax protein in the intestinal tissue was examined by Western blotting analysis, and the pathological changes of ileum tissue were observed under optical microscope. **Results** Most severe intestinal injury was found at the early stage of reperfusion, and the intestinal tissues almost recovered 12 h later. The phospho-JNK in the intestine was significantly elevated within 1 h after II/R compared with sham group ( $P < 0.01$ ). Cleaved caspase-3 was significantly increased in II/R group at 0.5 h, 1 h after reperfusion compared to sham group ( $P < 0.01$ ); the expression of Bcl-2 protein in II/R group was significantly decreased compared with the sham-operated group ( $P < 0.01$ ), and there was no significant difference in Bax expression between different groups. **Conclusion** JNK phosphorylation plays an essential role in the intestinal damages induced by II/R, possibly through down-regulating Bcl-2 protein expression and caspase-3 dependent apoptosis pathway.

**[Key words]** small intestine; reperfusion injury; apoptosis; c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase; caspase-3

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(2):140-143]

肠缺血再灌注(intestinal ischemia/reperfusion, II/R)是严重烧创伤及危重病患者的常见病理生理改变, 被认为是引发脓毒症及多器官功能衰竭的始动因素<sup>[1]</sup>。肠损伤后肠黏膜屏障功能受损, 促使肠

**[收稿日期]** 2009-09-29 **[接受日期]** 2009-11-15

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(30730091). Supported by Key Subject of National Natural Science Foundation of China (30730091).

**[作者简介]** 郑德义, 博士生. E-mail: deyizheng@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873471, E-mail: xiazhaoan@hotmail.com

道细菌及内毒素移位、中性粒细胞活化及氧自由基和细胞因子等的生成释放,导致肠道及远隔器官损害<sup>[2]</sup>。II/R 损伤引起的细胞凋亡也是肠上皮细胞死亡的一种主要机制<sup>[3]</sup>。

c-Jun 氨基端激酶(c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase, JNK)是丝裂原活化蛋白激酶家族的重要成员之一, JNK 信号通路的激活与细胞凋亡密切相关,同时抑制 JNK 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶活化可以减轻大鼠肠缺血再灌注损伤<sup>[4]</sup>,但是 JNK 活化在小鼠肠损伤中的作用尚不完全清楚。本实验通过建立 C57BL/6 小鼠 II/R 模型,以活化的半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 3(caspase-3)作为凋亡指标,观察不同再灌注时间小肠磷酸化 JNK(phospho-JNK)及凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 水平的变化过程,探讨 JNK 磷酸化(活化)及其介导的凋亡信号通路在 II/R 损伤中的可能作用及意义。

## 1 材料和方法

1.1 动物分组 10 周龄 SPF 级、健康雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 23~26 g,由第二军医大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(沪)2007-0003。经 12 h 昼夜交替、自由食水适应性饲养 1 周后用于本实验。动物随机分为假手术组(S)以及肠缺血后再灌注不同时间[即刻(0)、0.5、1、4、6 和 12 h]组,每组 6 只。

1.2 主要试剂 BCA 蛋白定量试剂盒为美国 Thermo 公司产品;全细胞裂解液,兔抗小鼠磷酸化 JNK (Thr183/Tyr185)、JNK、分裂型 Caspase-3 (Cleaved caspase-3)(Asp175)和 Bax 多克隆抗体, Bcl-2(50E3)单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin) IgG 抗体购自美国 Sigma 公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体、化学发光(ECL)试剂盒为美国 Santa Cruz 公司产品。

1.3 模型制备及标本采集 小鼠术前禁食 24 h,自由饮水,腹腔注入 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,仰卧位固定于电热保温毯上,同时电烤灯保温。常规消毒,经腹壁中线切口入腹,外置肠襻用温盐水纱布覆盖,暴露左侧腹腔,钝性分离并用无创动脉夹夹闭肠系膜前动脉近根部,暂时关闭腹腔。立即皮下注入生理盐水 0.5 ml,缺血 40 min 松开动脉夹,肠道血供恢复,缝线关闭腹腔。假手术组同样经历以上手术操作但不夹闭动脉。在拟定时间点麻醉后处

死小鼠,切取整段小肠立即置于冰面,距盲肠 5 cm 以近取出小肠约 15 cm,远端 1 cm 回肠经 10%多聚甲醛固定用于病理检查,余肠段立即置于冰盐水中,纵行剖开小肠,冰盐水漂洗去除肠内容物,置-70℃保存。

1.4 提取肠组织蛋白及蛋白免疫印迹(Western 印迹)分析 全细胞裂解液提取小肠组织总蛋白<sup>[5]</sup>,BCA 法定量蛋白浓度后,置-70℃保存。取 75  $\mu$ g 样品常规进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,半干电转移(300 mA、1 h)至 PVDF 膜上,用含 5%脱脂奶粉的 0.06% Tween-20 的三羟甲基氨基甲烷溶液(TBST)封闭 2 h 后洗膜,加入相应抗体(1:2 000)4℃过夜孵育,洗膜后加入山羊抗兔 IgG 抗体(1:5 000)于室温孵育 1 h,最后加入 ECL 试剂显色。经过电脑扫描成像,采用 Quantity one 软件分析相应蛋白条带的光密度(D)值。以 JNK 为 phospho-JNK 内参照, $\beta$ -肌动蛋白表达水平为凋亡相关蛋白内参照。

1.5 小肠组织大体及光镜检查 肉眼观察全小肠损伤情况,然后取距离盲肠 5 cm 以近 1 cm 回肠组织常规病理切片,H-E 染色,光学显微镜下观察回肠组织病理变化。

1.6 统计学处理 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析,两两比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 小肠大体及组织病理学改变 假手术组大体和 H-E 染色病理表现(图 1A)未见异常。肠缺血再灌注组肠损伤大体表现为小肠管扩张、肠腔积液明显,呈节段性出血、坏死,以空肠远端及回肠近端肠损伤最为严重;肠缺血 40 min 后再灌注 1 h 肠病理损伤最严重,表现为肠绒毛结构破坏,黏膜固有层、甚至隐窝弥漫性出血,伴有炎性细胞浸润(图 1B),而再灌注 12 h 肠组织结构基本恢复正常(图 1C)。

2.2 II/R 小鼠小肠组织 phospho-JNK 表达的动态变化 结果如图 2 所示,假手术组小鼠肠道仅检测到微弱的 JNK 活化,肠缺血再灌注即刻至伤后 1 h,小肠组织 JNK 持续活化,与假手术组比较分别增加 3.83、3.25、2.17 倍(各再灌注时间点磷酸化 JNK 相对值与假手术组平均值的比值),差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。此后随时间延长 JNK 活化下降,与假手术组比较差异无统计学意义。

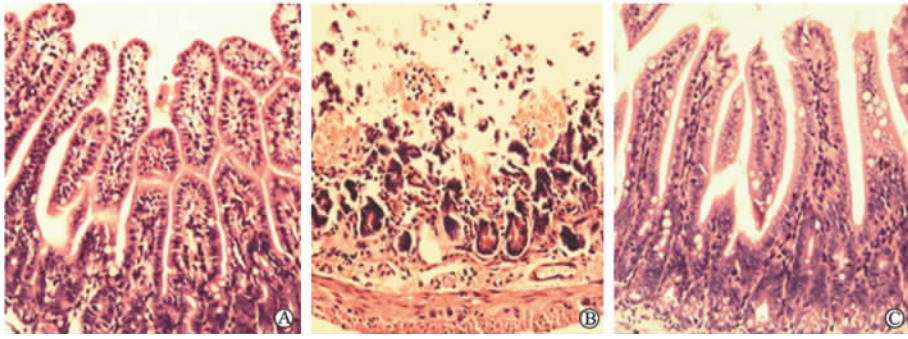


图 1 II/R 后回肠病理变化

Fig 1 Histopathologic changes of ileum in mice after intestinal ischemia/reperfusion(II/R)

A: Sham-operation group, normal intestinal histopathology. B: II/R 1 h group. The intestinal tissues had villi destruction, inflammatory cell infiltration and diffuse hemorrhage in lamina propria and crypt. C: II/R 12 h group, showing almost normal histopathology. Original magnification:  $\times 100$

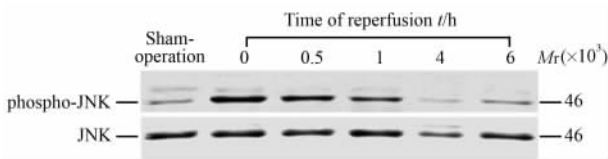


图 2 Western 印迹法检测 II/R 后小肠组织磷酸化 JNK 表达  
Fig 2 Phosphor-JNK expression in intestinal tissues after II/R as detected by Western blotting analysis

2.3 小肠组织凋亡相关蛋白活化 Caspases-3、Bcl-2 和 Bax 表达的动态变化 以分裂型 Caspases-3 的最小相对分子质量 17 000 代表 Caspases-3 最佳活化水平,并以活化 Caspase-3 程度作为凋亡判断指标。Western 蛋白免疫印迹结果(图 3)显示:假手术组 Caspases-3 无明显活化,至再灌注 0.5 h 和 1 h 小肠组织凋亡明显增加,Caspases-3 活化水平与假手术组比较有统计学差异( $P < 0.01$ )。

促凋亡蛋白 Bax 表达持续存在,各组间相互比较无统计学差异。在假手术组,小肠组织抗凋亡 Bcl-2 蛋白高水平表达;与假手术组比较,再灌注 0.5 h、1 h 和 4 h Bcl-2 蛋白表达显著下降( $P < 0.01$ )、而再灌注即刻和 6 h 与之比较无统计学差异。

### 3 讨论

本实验结果显示,C57BL/6 小鼠肠缺血 40 min 再灌注损伤早期即表现出严重的肠损伤,尤以再灌注 1 h 肠组织损害最严重,伤后 12 h 肠组织结构基本恢复正常,与 Udassin 等<sup>[6]</sup>以大鼠肠缺血 30 min 后再灌注肠损伤情况基本一致,进一步揭示了小肠缺血再灌注损伤与修复的动态变化规律,但应充分考虑动物种属差异、不同的缺血及再灌注时间对肠损伤的影响。另一方面,本研究以小肠组织表达活化的 Caspase-3 作为凋亡指标,观察肠缺血再灌注

细胞凋亡的动态变化,结果显示,肠缺血再灌注早期小肠组织活化 Caspase-3 水平显著增加,它作为细胞凋亡程序的最终执行者,导致小肠组织细胞凋亡。肠缺血再灌注除了直接导致细胞坏死外,细胞凋亡同样是肠损伤的重要方式<sup>[3]</sup>,但肠缺血再灌注介导的细胞凋亡信号通路目前尚不清楚。

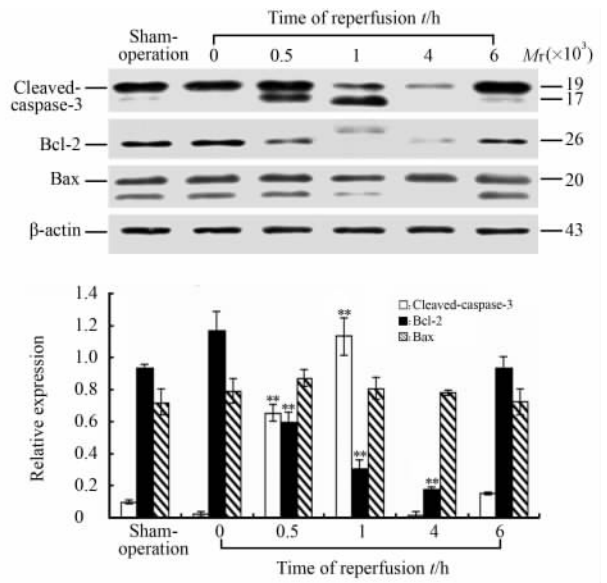


图 3 II/R 后小肠组织凋亡相关蛋白表达  
Fig 3 Expression of apoptotic proteins in II/R-induced intestine tissues by Western blotting analysis

\*\*  $P < 0.01$  vs sham-operation group;  $n = 6, \bar{x} \pm s$

JNK 也称应激活蛋白激酶,在缺血再灌注、内毒素(LPS)等多种应激条件下 JNK 磷酸化(活化)并转移到细胞核,激活活化蛋白-1(activator protein-1, AP-1),启动与细胞凋亡和增殖相关基因的转录及蛋白表达增加,从而调控细胞凋亡与增殖。本实验结果显示肠缺血即引起 JNK 活化显著增加,再灌注 1 h 内持续高水平活化。JNK 的活化可能引

起下游底物 c-fos、c-jun 基因转录增加<sup>[9]</sup>,从而促进肠缺血再灌注后细胞凋亡相关基因的转录及蛋白表达。心、肾缺血再灌注均能激活 JNK 信号转导通路引起心肌细胞和肾小管上皮细胞的凋亡<sup>[7-8]</sup>,抑制 JNK 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶活化,能减轻大鼠肠缺血再灌注损伤<sup>[4]</sup>,但 JNK 活化在肠缺血再灌注损伤中的机制仍不清楚。

由于 JNK 活化可通过影响 Bcl-2 凋亡蛋白家族的表达来调控细胞凋亡<sup>[10]</sup>,本实验进一步探讨小肠缺血再灌注肠损伤后凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达差异,结果表明,在缺血再灌注早期,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,而促凋亡蛋白 Bax 表达持续存在,组间水平无显著差异。Bcl-2 和 Bax 通常以二聚体结合形式调控细胞凋亡,Bcl-2 可通过减少氧自由基的产生和脂质过氧化物的形成、增加细胞内谷胱甘肽等抗氧化剂,从而发挥抗细胞凋亡作用。肠缺血再灌注导致 JNK 活化及抗凋亡蛋白 Bcl-2 下调,可能参与了 Caspase-3 依赖性细胞凋亡和组织坏死。

综上所述,小肠缺血再灌注损伤后细胞凋亡与组织坏死并存,在缺血再灌注肠损伤早期 JNK 持续活化、Bcl-2 蛋白表达下调和细胞凋亡增加与早期小肠病理损害之间,存在明显的时相关性。本实验初步揭示了肠缺血再灌注后 JNK 活化过程及其与肠损伤与凋亡的关系,对进一步阐明 JNK 的活化机制及其在 II/R 肠损伤中的作用具有指导意义。

## [参考文献]

[1] Oldenburg W A, Lau L L, Rodenberg T J, Edmonds H J, Burger C D. Acute mesenteric ischemia; a clinical review [J]. Arch Intern Med, 2004, 164: 1054-1062.

- [2] Sheng Z Y, Dong Y L, Wang X H. Bacterial translocation and multiple system organ failure in bowel ischemia and reperfusion [J]. Chin Med J (Engl), 1991, 104: 897-903.
- [3] Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, Koike M, Tamura J, Tong J, et al. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium [J]. Gut, 1998, 42: 530-537.
- [4] Murayama T, Tanabe M, Matsuda S, Shimazu M, Kamei S, Wakabayashi G, et al. JNK (c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase) and p38 during ischemia reperfusion injury in the small intestine [J]. Transplantation, 2006, 81: 1325-1330.
- [5] Jia Y T, Wei W, Ma B, Xu Y, Liu W J, Wang Y, et al. Activation of p38 MAPK by reactive oxygen species is essential in a rat model of stress-induced gastric mucosal injury [J]. J Immunol, 2007, 179: 7808-7819.
- [6] Udassin R, Vromen A, Haskel Y. The time sequence of injury and recovery following transient reversible intestinal ischemia [J]. J Surg Res, 1994, 56: 221-225.
- [7] Shima Y, Tajiri T, Taguchi T, Suita S. Increased expression of c-fos and c-jun in the rat small intestinal epithelium after ischemia-reperfusion injury: a possible correlation with the proliferation or apoptosis of intestinal epithelial cells [J]. J Pediatr Surg, 2006, 41: 830-836.
- [8] Aleshin A, Ananthkrishnan R, Li Q, Rosario R, Lu Y, Qu W, et al. RAGE modulates myocardial injury consequent to LAD infarction *via* impact on JNK and STAT signaling in a murine model [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294: H1823-H1832.
- [9] Terada Y, Inoshita S, Kuwana H, Kobayashi T, Okado T, Ichijo H, et al. Important role of apoptosis signal regulating kinase 1 in ischemic acute kidney injury [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 364: 1043-1049.
- [10] Tan J, Kuang W, Jin Z, Jin F, Xu L, Yu Q, et al. Inhibition of NF kappaB by activated c-jun NH<sub>2</sub> terminal kinase 1 acts as a switch for C2C12 cell death under excessive stretch [J]. Apoptosis, 2009, 14: 764-770.

[本文编辑] 孙岩