

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00447

潘妥洛克减轻胃缺血-再灌注损伤不依赖于抑制 Caspase-3 促凋亡途径

Protective effect of pantoloc against gastric ischemia-reperfusion injury is independent of Caspase-3 apoptosis pathway inhibition

王建明^{1,2}, 郑德义^{1,2}, 贾一韬¹, 付晋凤², 吕开阳¹, 郑兴锋¹, 夏照帆^{1*}

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** 探讨潘妥洛克减轻胃缺血-再灌注(I/R)损伤和凋亡途径的关系。**方法** C57BL/6小鼠随机分为假手术组、模型组(溶剂+手术组)、给药组(潘妥洛克+手术组),每组10只。夹闭小鼠腹腔动脉30 min后松开动脉夹再灌注1 h制作胃I/R模型,根据分组情况于手术前1 h腹腔注射溶剂10 ml/kg或2 mg/ml的潘妥洛克溶液10 ml/kg。再灌注1 h后取胃标本铺平,拍照软件分析计算出血百分比。应用蛋白免疫印迹法检测比较各组Caspase-8、分裂型Caspase-3、Bax、Bcl-2、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT)以及磷酸化AKT的表达水平。**结果** 给药组胃黏膜糜烂出血面积明显减少,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);给药组凋亡相关蛋白Caspase-8、分裂型Caspase-3、Bax及Bcl-2与模型组相比无明显差异,而上游促修复抑制凋亡的关键信号蛋白AKT的磷酸化水平比模型组明显降低($P < 0.01$)。**结论** 潘妥洛克减轻胃缺血-再灌注损伤不依赖于抑制Caspase-3促凋亡途径,而可能与潘妥洛克抑制AKT的磷酸化有关。

[关键词] 胃;再灌注损伤;细胞凋亡;Caspase-3;丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶

[中图分类号] R 573

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2010)04-0447-03

烧创伤应激、失血性休克、败血症、胃肠道某些血管性疾病常可引起急性胃黏膜损伤^[1-4],其损伤机制与胃的缺血-再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)密切相关。研究表明,胃缺血造成急性缺血缺氧,再灌注后产生大量氧自由基,引起黏膜损伤出血,其间细胞坏死和细胞凋亡同时存在^[5]。质子泵抑制剂减轻胃I/R损伤除了抑制胃酸,是否也通过凋亡途径尚不了解。本实验通过建立C57BL/6小鼠胃缺血-再灌注损伤模型,应用质子泵抑制剂潘妥洛克预处理,观察其对Caspase-3促凋亡通路相关蛋白Caspase-8、分裂型Caspase-3、Bax和Bcl-2,以及PI3K-AKT促修复信号通路关键蛋白AKT磷酸化水平的影响,旨在进一步探讨质子泵抑制剂的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 潘妥洛克为德国ALTANA公司产品;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AKT、磷酸化AKT、Caspase-8、分裂型Caspase-3(Asp175)、Bax多克隆抗体和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 β -肌动蛋白(β -actin)兔抗小鼠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。

1.2 动物分组 健康雄性C57BL/6小鼠,SPF级,812周龄,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。经过12 h昼夜交替、自由饮水及鼠齿类饲料适应性饲养1周后用于本实验。动物随机分为假手术组(sham+vehicle)、模型组(溶剂+手术, I/R+vehicle)和给药组(潘妥洛克+手术, I/R+pantoloc)。每组10只小鼠,其中4只用于大体观察拍照分析出血面积,6只用于分子生物学指标检测。

1.3 模型制备及标本采集 手术前小鼠禁食12 h,自由饮水。根据分组于手术前1 h腹腔注射溶剂(0.9% NaCl)10 ml/kg,或2 mg/ml的潘妥洛克溶液10 ml/kg。模型制备参照Wada等^[6]的方法,1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉,打开腹腔寻找并夹闭腹腔动脉,30 min后松开动脉夹形成再灌注。假手术组不夹闭腹腔动脉,余操作相同。于再灌注1 h后深麻醉处死动物后取材。采用随机数字法抽取大体观察拍照和分子生物学检测的动物个体,用于大体观察和拍照的胃标本沿纵轴大弯侧剖开并漂洗内容物后平铺拍照,用于分子生物学检测的胃组织立即置于冰盐水中,剖开后用冰盐水漂洗去除胃内容物,置-80℃冷冻保存。

1.4 胃黏膜出血面积分析 用Image J 1.4图像分析软件对各组胃黏膜出血面积(整个照片中的红色区域)进行识别计算,并计算出血面积所占全胃黏膜面积的百分比进行统计

[收稿日期] 2009-12-11

[接受日期] 2010-01-07

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

[作者简介] 王建明,博士。E-mail: wzmzyy@163.com

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

分析^[6]。

1.5 胃组织蛋白提取及蛋白免疫印迹(Western blotting)分析 全细胞裂解液提取胃组织总蛋白的方法同文献^[7], BCA法定量蛋白浓度后,-80℃保存。取100 μg样品加样后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白分子半干法电转至PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉和0.06% Tween-20的三羟甲基氨基甲烷溶液(TBST)封闭40 min后洗膜,加入相应抗体(1:1 000)4℃过夜孵育,将膜漂洗后加入兔抗小鼠IgG抗体(1:1 000)于室温孵育1 h,最后加入ECL化学发光试剂暗室曝光底片。底片扫描后用Image J 1.4软件进行蛋白条带的光密度值分析。磷酸化AKT以AKT表达水平为参照,其余凋亡相关蛋白以β-actin表达水平为内参照。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS 11.0统计软件进行方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃黏膜出血面积比较 假手术组胃黏膜基本正常;模型组胃黏膜出血明显,约占全胃面积的(26.33±4.63)%,与假手术组相比差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,潘妥洛克20 mg/kg预处理后(给药组)胃黏膜出血面积明显减少($P < 0.01$,图1)。

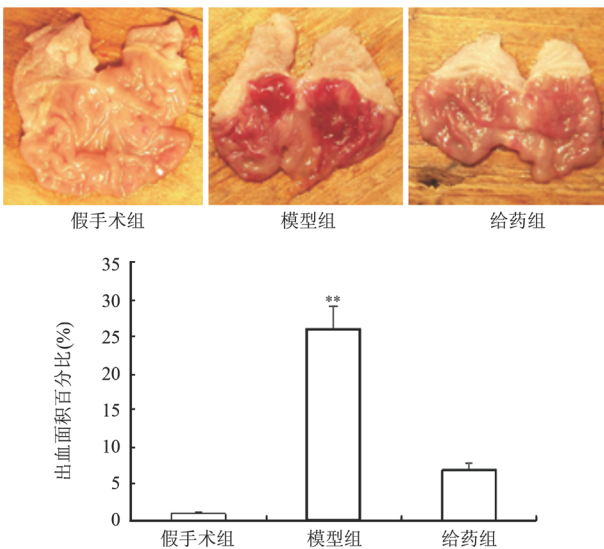


图1 各组胃黏膜出血面积比较
** $P < 0.01$ 与其他组比较, $n = 4, \bar{x} \pm s$

2.2 胃组织中凋亡相关蛋白的表达 模型组Caspase-8、分裂型Caspase-3和Bcl-2蛋白表达与假手术组相比均明显升高($P < 0.01$),给药组与模型组相比无明显差异。Bax蛋白表达在各组间无明显差异(图2)。

2.3 各组胃组织磷酸化和非磷酸化AKT表达 AKT磷酸化活化在模型组明显高于假手术组($P < 0.01$),与模型组相比潘妥洛克20 mg/kg预处理后AKT磷酸化活化明显降低($P < 0.01$,图3)。

3 讨论

胃的缺血-再灌注损伤可能比我们以往所认识到的更为

普遍。在危重病和严重创伤休克患者常见的应激性消化道出血^[4],其本质尚未完全阐明,文献提示其机制与消化道缺血-再灌注损伤相似^[5,7]。质子泵抑制剂减轻胃缺血-再灌注损伤,是否影响凋亡途径尚无研究报道。但有文献报道应用质子泵抑制剂会促进移植物抗宿主反应的胃黏膜细胞凋亡^[8],还可以诱导人类B细胞瘤的凋亡^[9]。本实验建立了C57BL/6小鼠胃缺血-再灌注损伤模型,结果显示,C57BL/6小鼠胃缺血30 min再灌注1 h能引起明显的胃黏膜出血糜烂,与Wada等^[6]以大鼠胃缺血-再灌注肠损伤情况基本一致。提前给予质子泵抑制剂潘妥洛克干预后可以明显减少胃黏膜糜烂出血面积。对凋亡相关蛋白的检测发现,胃缺血-再灌注引起胃组织Caspase-8、分裂型Caspase-3和Bcl-2明显升高($P < 0.01$),提前给予潘妥洛克干预并不能逆转Caspase-8、分裂型Caspase-3和Bcl-2的升高;促凋亡蛋白Bax表达在各组间无明显差异。提示潘妥洛克减轻胃缺血-再灌注黏膜糜烂出血不依赖于抑制Caspase-3促凋亡通路。

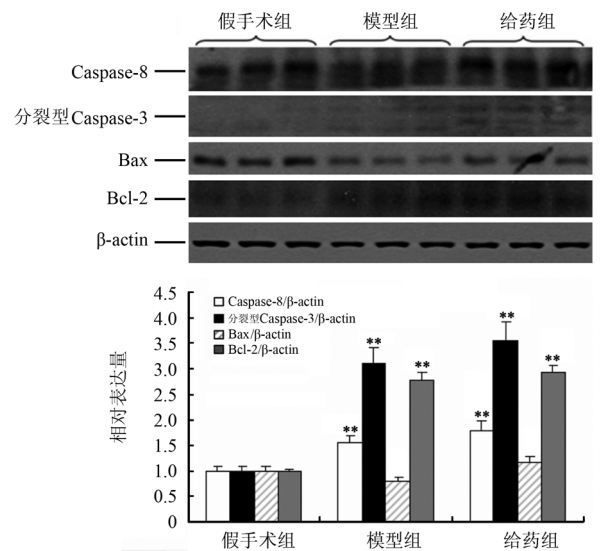


图2 蛋白免疫印迹法检测缺血-再灌注后各组胃组织凋亡相关蛋白表达
** $P < 0.01$ 与假手术组比较, $n = 6, \bar{x} \pm s$

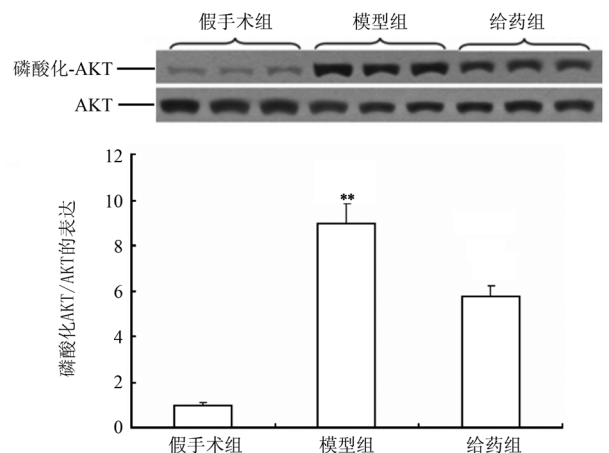


图3 各组胃组织AKT磷酸化水平比较
** $P < 0.01$ 与其他组比较, $n = 6, \bar{x} \pm s$

凋亡通路是一个复杂的调控网络,促修复和凋亡同时并存,并处于某种动态平衡。AKT 蛋白磷酸化在 PI3K-AKT 促修复信号通路中起关键作用^[10]。本实验发现,潘妥洛克预处理组 AKT 磷酸化水平比模型组明显降低($P < 0.01$)。提示潘妥洛克预处理可能抑制了 PI3K-AKT 促修复信号通路活化。

综上所述,潘妥洛克预处理明显减轻胃黏膜糜烂出血不依赖于抑制 Caspase-3 促凋亡通路,而可能与其抑制 PI3K-AKT 促修复信号通路关键蛋白 AKT 磷酸化有关,尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Sugawa C, Steffes C P, Nakamura R, Sferra J J, Sferra C S, Sugimura Y, et al. Upper GI bleeding in an urban hospital. Etiology, recurrence, and prognosis[J]. *Ann Surg*, 1990, 212: 521-527.
- [2] Jean-Claude J M, Reilly L M, Stoney R J, Messina L M. Para-aortic aneurysms: the future of open aortic aneurysm repair[J]. *J Vasc Surg*, 1999, 29: 902-912.
- [3] Duerksen D R. Stress-related mucosal disease in critically ill patients[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2003, 17: 327-344.
- [4] Steinberg K P. Stress-related mucosal disease in the critically ill patient: risk factors and strategies to prevent stress-related bleeding in the intensive care unit[J]. *Crit Care Med*, 2002, 30 (6 Suppl): S362-S364.
- [5] Ohta Y, Kobayashi T, Nishida K, Ishiguro I. Relationship between changes of active oxygen metabolism and blood flow and formation, progression, and recovery of lesions is gastric mucosa of rats with a single treatment of compound 48/80, a mast cell degranulator[J]. *Dig Dis Sci*, 1997, 42: 1221-1232.
- [6] Wada K, Kamisaki Y, Kitano M, Kishimoto Y, Nakamoto K, Itoh T. A new gastric ulcer model induced by ischemia-reperfusion in the rat: role of leukocytes on ulceration in rat stomach[J]. *Life Sci*, 1996, 59: PL295-PL301.
- [7] 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.
- [8] Welch D C, Wirth P S, Goldenring J R, Ness E, Jagasia M, Washington K. Gastric graft-versus-host disease revisited: does proton pump inhibitor therapy affect endoscopic gastric biopsy interpretation[J]? *Am J Surg Pathol*, 2006, 30: 444-449.
- [9] De Milito A, Iessi E, Logozzi M, Lozupone F, Spada M, Marino M L, et al. Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 5408-5417.
- [10] Cardone M H, Roy N, Stennicke H R, Salvesen G S, Franke T F, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation[J]. *Science*, 1998, 282: 1318-1321.

[本文编辑] 孙岩