

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.0250

## p38 丝裂原活化蛋白激酶在小鼠胃缺血-再灌注损伤中的作用

王建明<sup>1,2</sup>, 郑德义<sup>1,2</sup>, 贾一韬<sup>1</sup>, 付晋凤<sup>2</sup>, 郑兴锋<sup>1</sup>, 吕开阳<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 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)在小鼠胃缺血-再灌注损伤中的作用。**方法** C57BL/6 小鼠随机分为 3 组:假手术组、模型组和 CNI-1493 预处理组, CNI-1493 预处理组于术前 1 h 腹腔注射 p38 MAPK 抑制剂 CNI-1493(2 mg/ml)溶液 10 ml/kg。通过夹闭小鼠腹腔动脉 30 min 后松开动脉夹再灌注 1 h 制作胃缺血-再灌注损伤模型。再灌注 1 h 后取胃标本, 甲醛固定后铺平拍照, 计算胃黏膜出血面积百分比。应用蛋白质印迹法检测并比较各组磷酸化及总 p38、JNK、ERK, 磷酸化 NF- $\kappa$ B p65 以及分裂型 Caspase-3 的表达水平。**结果** 与假手术组比较, 模型组胃黏膜出血面积明显增大 ( $P < 0.05$ ), p38、JNK 以及 ERK 明显激活 ( $P < 0.05$ ), 磷酸化 NF- $\kappa$ B p65 以及促凋亡蛋白激活型 Caspase-3 表达明显增多 ( $P < 0.05$ )。CNI-1493 预处理能明显逆转上述改变 ( $P < 0.05$ )。**结论** MAPK/NF- $\kappa$ B 通路活化在胃缺血-再灌注损伤中起到重要作用, p38 MAPK 抑制剂 CNI-1493 能抑制 MAPK/NF- $\kappa$ B 通路活化、减少凋亡蛋白表达, 减轻胃缺血-再灌注引起的黏膜出血。

**[关键词]** 胃; 再灌注; 丝裂原活化蛋白激酶; NF- $\kappa$ B; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R 656.6

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2010)03-0250-04

### Role of p38 MAPK in ischemia/reperfusion-induced gastric injury in mice

WANG Jian-ming<sup>1,2</sup>, ZHENG De-yi<sup>1,2</sup>, JIA Yi-tao<sup>1</sup>, FU Jin-feng<sup>2</sup>, ZHENG Xing-feng<sup>1</sup>, LÜ Kai-yang<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 investigate the role of p38 MAPK on gastric ischemia/reperfusion (I/R)-induced injury in mice. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: sham+vehicle group, I/R+vehicle group (as control), and I/R+CNI-1493 group. The gastric I-R injury mice were prepared by occluding the celiac artery for 30 min followed by reperfusion for 1 h. Sham-operated animals underwent the same surgical procedure without clamping. Physiological saline (0.9% NaCl, 10 ml/kg) or CNI-1493 (a p38 MAPK inhibitor, 10 ml/kg, 2 mg/ml) was intraperitoneally administered 1 h before ischemia. A picture of the whole stomach was obtained after fixation with formalin, and the bleeding area in the whole stomach was obtained by a digital imaging analyzer (Image J 1.4, NIH). The levels of phospho- and total-mitogen-activated protein kinases (MAPKs including p38, JNK, and ERK), phospho-nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and cleaved Caspase-3 in the injured stomach tissue were determined by Western blotting analysis. **Results** Compared with sham+vehicle group, I/R group had markedly larger gastric bleeding area ( $P < 0.05$ ), activated p38, JNK, and ERK ( $P < 0.05$ ), and markedly increased NF- $\kappa$ B p65 and cleaved Caspase-3 expression ( $P < 0.05$ ). Pretreatment with CNI-1493 significantly inhibited the above changes in I/R group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Activation of MAPK/NF- $\kappa$ B pathway play a very important role in I/R-induced gastric injury. Pretreatment with p38 MAPK inhibitor, CNI-1493, can inhibit MAPK/NF- $\kappa$ B pathway, decrease expression of apoptosis protein expression, and reduce gastric mucosal bleeding.

**[Key words]** stomach; reperfusion injury; mitogen-activated protein kinase; NF- $\kappa$ B; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(3):250-253]

胃缺血-再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤可能比我们以往认识到的更为普遍, 其不仅发生于危重患者<sup>[1-2]</sup>, 常见的应激性溃疡患者发病机制中包含了交感神经兴奋, 引起胃黏膜持续性血供不足

**[收稿日期]** 2009-12-23 **[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, 博士生。E-mail: wzmzyy@163.com

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

以及血流恢复引起的再灌注<sup>[3-4]</sup>。因此,应激性溃疡与胃缺血-再灌注损伤的发病机制是否重叠越来越受到研究人员的关注,对两种损伤分子机制研究,可望为临床防治应激性溃疡和胃缺血-再灌注损伤提供新的治疗靶点。

近来本实验室对应激性溃疡的发病机制进行了深入的研究,发现丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/核因子(NF)- $\kappa$ B 信号通路在应激性溃疡发病过程中发挥关键作用<sup>[5-6]</sup>。为了探讨 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路是否在胃缺血-再灌注损伤中也发挥重要作用,本研究建立了 C57BL/6 小鼠胃缺血-再灌注损伤模型,并应用 p38 MAPK 抑制剂 CNI-1493 进行干预,观察了小鼠胃黏膜出血损伤以及 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路、Caspase-3 促凋亡通路活化的变化,现报告如下。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂 健康雄性 C57BL/6 小鼠,SPF 级,8~12 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。CNI-1493 购自 Cytokine PharmaSciences 公司;BCA 蛋白定量试剂盒为 Thermo 公司产品;全细胞裂解液,兔抗小鼠磷酸化 p38(p-p38)和非磷酸化 p38(p38)、磷酸化 JNK(p-JNK)和非磷酸化 JNK(JNK)、磷酸化 ERK(p-ERK)和非磷酸化 ERK(ERK)、磷酸化 NF- $\kappa$ B p65 (p-NF- $\kappa$ B p65) 以及激活型 Caspase-3 (cleaved Caspase-3)单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;辣根过氧化物酶标记  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)的兔抗小鼠 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 适应性饲养 1 周后,将动物随机分为 3 组:假手术组(sham+vehicle)、模型组(溶剂+手术, I/R+vehicle)、CNI-1493 预处理组(I/R+CNI-1493),每组 10 只小鼠。

1.3 模型制备及标本采集 手术前小鼠禁食 12 h,自由饮水。假手术组和模型组于术前 1 h 腹腔注射溶剂 0.9% NaCl 10 ml/kg, CNI-1493 预处理组术前 1 h 腹腔注射 2 mg/ml 的 CNI-1493 溶液 10 ml/kg。I/R 手术方法参照文献<sup>[7]</sup>,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。假手术组操作相同但不夹闭腹腔动脉。于再灌注 1 h 深麻醉后处死动物取材。随号抽取 4 只动物用作大体观察拍照分析出血面积,6 只用作分子生物学指标检测。用于大体观察和拍照的胃标本甲醛固定 5 min 后沿纵轴大

弯侧剖开漂洗内容物后平铺拍照<sup>[7]</sup>,用于分子生物学检测的胃组织立即置于冰生理盐水中,剖开后用冰生理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 参照 Wada 等<sup>[7]</sup>的描述,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,结果以出血面积所占全胃黏膜的百分比表示。

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方法同文献<sup>[5]</sup>,BCA 法定量蛋白浓度后,置-80℃保存。取 100  $\mu$ g 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% 脱脂奶粉的 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。p-p38、p-JNK、p-ERK 分别以 p38、JNK、ERK 表达水平为参照,p-NF- $\kappa$ B 和 cleaved Caspase-3 则以  $\beta$ -actin 表达水平为内参照。

1.6 统计学处理 数据结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用 SPSS 11.0 统计软件进行数据分析,多组间比较采用方差分析,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 胃黏膜出血面积比较 结果如图 1 所示,假手术组胃黏膜出血不明显,模型组出血面积约占全胃面积的(22.13 $\pm$ 5.37)%,与假手术组相比明显增加,且差异有显著统计学意义( $P=0.0014$ );CNI-1493 预处理组胃黏膜出血面积约为(8.46 $\pm$ 1.31)%,与模型组相比明显减少,两组差异有显著统计学意义( $P=0.0026$ )。

2.2 各组胃组织磷酸化 NF- $\kappa$ B p65 和激活型 Caspase-3 表达 结果如图 2 所示,模型组 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化明显高于假手术组( $P=0.007$ ),与模型组相比 CNI-1493 预处理组磷酸化 NF- $\kappa$ B p65 表达明显下降( $P=0.031$ );模型组 cleaved Caspase-3 表达明显高于假手术组( $P=0.014$ ),与模型组相比 CNI-1493 预处理组 cleaved Caspase-3 表达明显降低( $P=0.002$ )。

2.3 胃组织中 MAPK 信号蛋白的活化 结果如图 3 所示,模型组磷酸化 MAPK 信号蛋白与假手术相比表达均明显升高,差异有统计学意义(p-p38, $P=0.002$ ;p-JNK, $P=0.018$ ;p-ERK, $P=0.001$ ),表明

MAPK 通路活化;与模型组相比,CNI-1493 预处理组上述蛋白的表达水平均明显降低,差异有统计学意义( $p$ -p38,  $P=0.001$ ;  $p$ -JNK,  $P=0.014$ ;  $p$ -ERK,  $P=0.001$ ),表明其活性受到抑制。

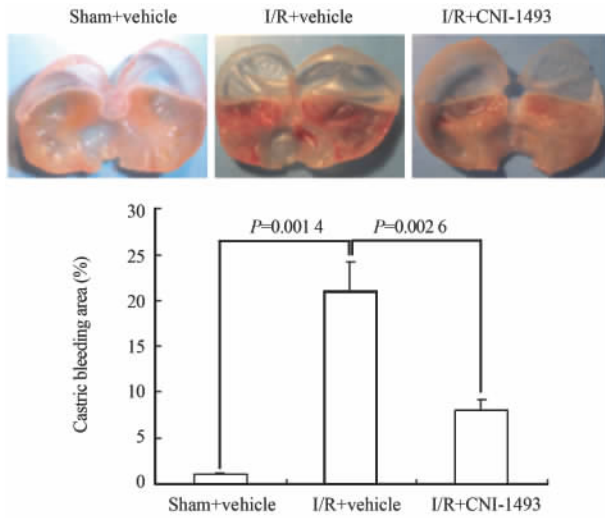


图1 各组胃黏膜出血面积比较

Fig 1 Gastric mucosal bleeding area in different groups

$n=4, \bar{x} \pm s$

剂在抑制急、慢性刺激因素引起 MAPK 信号通路活化同时降低核因子转录活性,从而减轻 NF- $\kappa$ B 转录活性增加造成的炎症因子表达、凋亡等引起的组织损伤<sup>[10-11]</sup>。本实验室以往对应激性溃疡研究证实, MAPK 通路在应激性溃疡发病过程中发挥关键作用, p38 MAPK 抑制剂能够明显减轻应激性溃疡<sup>[5]</sup>;也有研究发现, p-JNK 和 p-p38 MAPK 在大鼠胃缺血-再灌注损伤后被激活<sup>[12]</sup>。MAPK 通路是不是胃应激性溃疡和胃缺血-再灌注损伤存在的共同分子机制? p38 MAPK 抑制剂能否同样减轻胃缺血-再灌注损伤? 本研究对 MAPK 通路及 p38 MAPK 抑制剂在小鼠胃缺血-再灌注损伤中的作用进行了探讨。

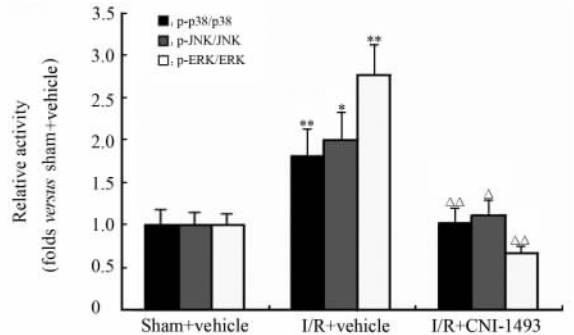
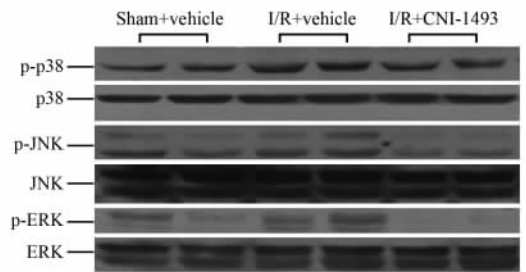


图3 免疫印迹法检测缺血-再灌注后各组胃组织 MAPK 信号蛋白水平

Fig 3 Relative activity of MAPKs analyzed by Western blotting analysis in different groups

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs sham + vehicle group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs I/R + vehicle group;  $n=6, \bar{x} \pm s$

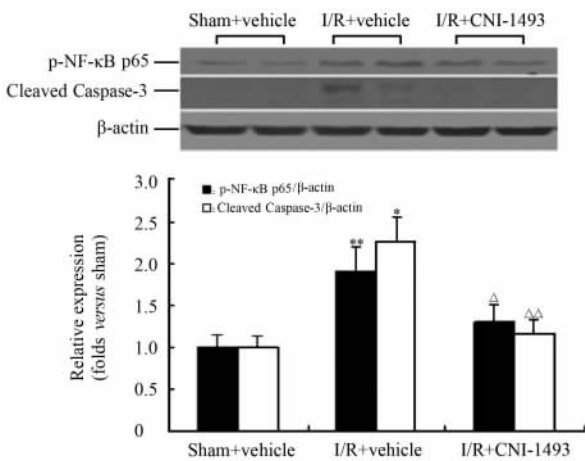


图2 各组胃组织中磷酸化 NF- $\kappa$ B 以及分裂型 Caspase-3 表达水平比较

Fig 2 Expression of phospho-NF- $\kappa$ B and cleaved Caspase-3 analyzed as detected by Western blotting analysis in different groups

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs sham + vehicle group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs I/R + vehicle group;  $n=6, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

MAPK 途径对缺血缺氧敏感,其活化后引起 NF- $\kappa$ B 的转录活性增加,使炎症因子表达及细胞凋亡增加<sup>[8-9]</sup>。大量的研究已经表明, p38 MAPK 抑制

本研究发现小鼠胃缺血-再灌注损伤与 Wada 等<sup>[7]</sup>报道的大鼠胃缺血-再灌注损伤情况基本一致,胃缺血 30 min 再灌注 1 h 后引起大面积胃黏膜出血糜烂,提前给予 p38 MAPK 抑制剂 CNI-1493 干预,可以明显减少胃黏膜糜烂出血面积。蛋白质免疫印迹检测结果显示,胃缺血-再灌注后,胃组织 p-p38、p-JNK、p-ERK、磷酸化 NF- $\kappa$ B p65 以及激活型 Caspase-3 表达均明显升高, CNI-1493 预处理后上述蛋白表达明显被抑制。上述结果提示, MAPK/

NF- $\kappa$ B 通路活化在胃缺血-再灌注损伤中起到重要作用,用 CNI-1493 抑制 p38 MAPK 可明显减轻胃缺血-再灌注引起的黏膜糜烂出血。

Caspase-3 是凋亡通路的关键蛋白,是凋亡的最终执行者,受多条上游信号的调节。既往研究发现,在大鼠应激性溃疡模型中,应用 p38 MAPK 抑制剂阻断 MAPK 信号通路或 NF- $\kappa$ B 特异性抑制剂阻断 NF- $\kappa$ B 活化,均可减轻应激造成的胃黏膜细胞凋亡<sup>[5-6]</sup>。在本研究中,应用 p38 MAPK 抑制剂 CNI-1493 干预小鼠胃缺血-再灌注损伤,观察到的 MAPK 信号通路活化及其下游 NF- $\kappa$ B 表达被抑制,同时凋亡关键蛋白激活型 Caspase-3 表达下降,提示 CNI-1493 减少胃黏膜出血与激活型 Caspase-3 促凋亡蛋白表达下调有关。

综上所述,胃缺血-再灌注损伤能激活 MAPK 通路, p38 MAPK 抑制剂 CNI-1493 能够抑制 MAPK/NF- $\kappa$ B 通路活化、减少凋亡蛋白表达,减轻胃缺血-再灌注引起的黏膜糜烂出血;提示 MAPK/NF- $\kappa$ B 通路活化可促进胃缺血-再灌注损伤, p38 MAPK 抑制剂类对于防治胃缺血-再灌注损伤具有潜在的临床应用价值。

#### [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] 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.
- [3] Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside [J]. *Gastroenterology*, 2008,

135:41-60.

- [4] Das D, Bandyopadhyay D, Bhattacharjee M, Banerjee R K. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration [J]. *Free Radic Biol Med*, 1997, 23: 8-18.
- [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] Jia Y T, Ma B, Wei W, Xu Y, Wang Y, Tang H T, et al. Sustained activation of nuclear factor-kappaB by reactive oxygen species is involved in the pathogenesis of stress-induced gastric damage in rats [J]. *Crit Care Med*, 2007, 35: 1582-1591.
- [7] 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.
- [8] Saccani S, Pantano S, Natoli G. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3: 69-75.
- [9] Chen X L, Xia Z F, Wei D, Han S, Ben D F, Wang G Q. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in Kupffer cell secretion of the proinflammatory cytokines after burn trauma [J]. *Burns*, 2003, 29: 533-539.
- [10] Underwood D C, Osborn R R, Kotzer C J, Adams J L, Lee J C, Webb E F, et al. SB 239063, a potent p38 MAP kinase inhibitor, reduces inflammatory cytokine production, airways eosinophil infiltration, and persistence [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 293: 281-288.
- [11] Barone F C, Irving E A, Ray A M, Lee J C, Kassir S, Kumar S, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase provides neuroprotection in cerebral focal ischemia [J]. *Med Res Rev*, 2001, 21: 129-145.
- [12] Li L, Zhang Y M, Qiao W L, Zhang J F, Wang L. Role of mitogen-activated protein kinases in the regulation of paraventricular nucleus to gastric ischemia-reperfusion injuries [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120: 1082-1087.

[本文编辑] 孙岩