

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00254

## p38 丝裂原活化蛋白激酶在小鼠肠缺血再灌注肺损伤中的作用

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>, 廖庚进<sup>1,2</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 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)在小鼠肠缺血再灌注肺损伤中的作用。**方法** 10 周龄健康雄性 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组、缺血再灌注组和缺血再灌注+SB239063 处理组(SB239063 组), SB239063 组于术前 1 h 腹腔注入 p38 MAPK 抑制剂 SB239063(3 mg/kg), 另两组注入等量生理盐水。采用夹闭 C57BL/6 小鼠肠系膜前动脉 45 min 后再灌注 6 h 的方法造成肠缺血再灌注损伤模型。处死小鼠取肺标本, 蛋白质印迹法检测肺组织磷酸化 p38 MAPK 蛋白水平, RT-PCR 检测肺组织 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 表达, H-E 染色观察肺组织病理学改变。**结果** 肠缺血再灌注导致明显肺损伤, 肺组织 p38 MAPK 活化明显增加, TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  基因表达水平明显升高(与假手术组比较  $P < 0.01$ ); SB239063 可抑制肺组织 p38 MAPK 活化, 减轻小肠缺血再灌注引起的肺损伤, 并下调肺组织 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 表达(与缺血再灌注组比较  $P < 0.05$ )。**结论** p38 MAPK 在小鼠肠缺血再灌注肺损伤中起重要作用, 抑制 p38 MAPK 活化可减轻肠缺血再灌注肺损伤。

**[关键词]** 小肠; 再灌注损伤; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 肺损伤; SB239063

**[中图分类号]** R 656.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)03-0254-04

### Role of p38 MAPK signaling in lung injury following intestinal ischemia/reperfusion in mice

ZHENG De-yi<sup>1,2</sup>, WANG Jian-ming<sup>1,2</sup>, JIA Yi-tao<sup>1</sup>, FU Jin-feng<sup>2</sup>, LÜ Kai-yang<sup>1</sup>, LIAO Geng-jin<sup>1,2</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 investigate the possible role of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in lung injury following intestinal ischemia reperfusion (II/R) in mice. **Methods** Intestinal ischemia/reperfusion was induced by occluding the superior mesenteric artery for 45 min followed by 6 h reperfusion. C57BL/6 mice were randomly divided into sham-operated group (sham group), II/R group and II/R plus SB239063 treatment (SB239063 group),  $n = 6/\text{group}$ . SB239063 (3 mg/kg), a novel second-generation p38 MAPK inhibitor, was administered intraperitoneally one hour before clamping. Pulmonary p38 MAPK and phospho-p38 MAPK protein were measured by Western blotting analysis. Gene expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the lung was analyzed by RT-PCR. The lung pathology was observed by optical microscope. **Results** Compared with the sham-operated group, pulmonary p38 MAPK activation was significantly increased 6 h after II/R ( $P < 0.01$ ), whereas SB239063 could markedly attenuate p38 MAPK activation in lung tissue ( $P < 0.05$ ). In addition, the increased TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA levels induced by II/R in lungs were significantly blocked by inhibiting p38 MAPK activation ( $P < 0.05$ ). SB239063 treatment ameliorated the pathologic lung injury induced by II/R. **Conclusion** p38 MAPK plays an important role in lung injury induced by intestinal ischemia reperfusion (II/R) in mice, and inhibition of p38 MAPK activation prevents lung injury following II/R in mice.

**[Key words]** intestinal; reperfusion injury; p38 mitogen-activated protein kinase; lung injury; SB239063

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(3):254-257]

**[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), 上海市重点课题(08411952800). Supported by Key Program of National Natural Science Foundation of China (30730091) and the Key Science and Technology Foundation of Shanghai Municipality(08411952800).

**[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

肠缺血再灌注(intestinal ischemia/reperfusion, I/R)损伤常见于严重创(烧)伤、休克、坏死性肠炎及危重病患者。肠缺血再灌注可促进肠道细菌和内毒素移位,产生炎性介质如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等,除引起肠道局部损伤外,还可导致全身远隔器官特别是肺损伤<sup>[1]</sup>,临床上常表现为急性呼吸窘迫综合征,有极高的发病率及病死率。

p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)属于 MAPK 家族成员,在损伤、感染和氧化应激等多种条件下发生磷酸化(活化),参与炎症、细胞凋亡及细胞生长等过程<sup>[2]</sup>。有研究表明, p38 MAPK 参与了大鼠肠缺血再灌注损伤过程,抑制 p38 MAPK 可减轻大鼠肠道炎性反应,减轻肠上皮细胞损害<sup>[3-4]</sup>,也能有效防治脓毒症及严重烧伤后肺损伤<sup>[5-6]</sup>,但是有关 p38 MAPK 在肠缺血再灌注后肺损伤中的作用目前尚不清楚。本研究以 C57BL/6 小鼠为实验对象,探讨 p38 MAPK 在肠缺血再灌注后肺损伤中的可能作用及其机制。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂及药物 TRIzol 试剂为 Invitrogen 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、兔磷酸化 p38 MAPK (phospho-p38 MAPK) (Thr180/Tyr182)单克隆抗体和兔 p38 MAPK 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体、电化学发光(ECL)试剂盒为美国 Santa Cruz 公司产品。p38 MAPK 特异性抑制剂 SB239063 为德国 Calbiochem 公司产品(货号 559404)。

1.2 动物分组及给药 10 周龄健康雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 22~26 g,购于第二军医大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK(沪)2007-0003。适应性饲养 1 周后用于本实验。随机分为假手术组、缺血再灌注组和缺血再灌注 + SB239063 处理组(SB239063 组),每组 6 只。术前禁食 24 h,自由饮水。SB239063 组于术前 1 h 腹腔注射 SB239063 (3 mg/kg),另 2 组注入等量生理盐水,药物配制及用药剂量参照文献<sup>[7]</sup>。

1.3 肠缺血再灌注模型制备及标本的采集 小鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,仰卧位固定置于电热保温毯上,常规 0.5%碘伏消毒,经腹壁中线切口入腹腔,外置肠襻以温盐水纱布覆盖,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,假手术组不夹闭,暂时关闭腹腔,皮下注入

生理盐水 0.5 ml,缺血 45 min 松开动脉夹,恢复肠道血供,缝线关闭腹腔,自由饮水。再灌注 6 h 后麻醉处死小鼠,立即取部分肺组织于冰盐水中漂洗,置 -80℃ 深低温冰柜保存,用于 RT-PCR 和蛋白质免疫印迹检测;取右上肺叶以 10%多聚甲醛固定,用于病理学检查。

1.4 RT-PCR 方法检测肺组织 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 转录水平 用 TRIzol 提取肺组织总 RNA,逆转录合成 cDNA,经 PCR 扩增目的基因。RNA 引物由上海生工生物工程服务有限公司合成, TNF- $\alpha$  上游引物 5'-GAG TCC GGG CAG GTC TAC TTT-3',下游引物 5'-CAG GTC ACT GTC CCA GCA TCT-3',产物 235 bp;IL-1 $\beta$  上游引物 5'-GGC TGG ACT GTT TCT AAT GC-3',下游引物 5'-ATG GTT TCT TGT GAC CCT GA-3',产物 134 bp; $\beta$ -actin 上游引物 5'-CCT CTA TGC CAA CAC AGT GC-3',下游引物 5'-GTA CTC CTG CTT GCT GAT CC-3',产物 211 bp。将 PCR 扩增产物行 1%琼脂糖凝胶电泳后,紫外线下拍照,用 Quantity one 图像分析软件(美国 Bio-Rad 公司)处理,记录光密度值,以目的基因与  $\beta$ -actin 光密度值的比值计算其相对表达量。

1.5 蛋白质印迹方法检测肺组织 p38 MAPK 和 phospho-p38 MAPK 表达 参照 Jia 等<sup>[7]</sup>方法进行。使用全细胞裂解液提取肺组织总蛋白,BCA 法定量蛋白浓度后,置 -80℃ 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,电转移至 PVDF 膜上,用含 5%脱脂奶粉的 0.05% Tween-20 的三羟甲基氨基甲烷溶液(TBST)封闭后,加入 1:2 000 稀释的抗 phospho-p38 MAPK 或 1:4 000 稀释的抗 p38 MAPK 抗体,4℃ 过夜孵育,洗膜后加入 1:5 000 稀释的二抗于室温孵育 1 h,最后加入 ECL 试剂显色。经过电脑扫描成像(TIF 格式),采用 Quantity one 软件分析,记录相应蛋白条带的光密度值,以 p38 MAPK 表达水平为内参照。

1.6 病理学检查 右上叶肺组织常规病理切片,H-E 染色,光镜下观察肺组织病理变化。

1.7 统计学处理 数据结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 肠缺血再灌注后肺组织 p38 MAPK 活化 结果如图 1 所示,肠缺血后再灌注 6 h 小鼠肺组织磷酸化 p38 MAPK 明显增多,与假手术组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),说明肠缺血再灌注后 p38

MAPK 活化水平明显升高;而 SB239063 能明显抑制肺组织 p38 MAPK 活化( $P<0.05$ )。

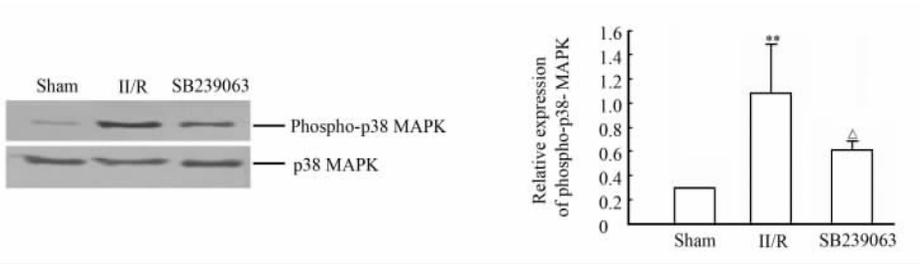


图 1 蛋白质印迹法检测各组肺组织 p38 MAPK 活化水平

Fig 1 Expression of p38 MAPK and phospho-p38 MAPK in lung tissue by Western blotting analysis

II/R: Intestinal ischemic/reperfusion. \*\*  $P<0.01$  vs sham group, Δ  $P<0.05$  vs II/R group;  $n=6$ ,  $\bar{x}\pm s$

2.2 肠缺血再灌注后肺组织的病理变化 结果如图 2 所示,假手术组肺组织正常;肠缺血再灌注 6 h 造成明显肺损伤,病理表现为肺泡壁明显增厚,肺间质和肺泡出血水肿,炎性细胞浸润;而 SB239063 组与肠缺血再灌注组相比肺病理损伤程度较轻。

表达的变化 RT-PCR 结果如图 3 所示,可见肠缺血再灌注组 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  基因表达水平明显升高,与假手术组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ );使用 p38 MAPK 抑制剂 SB239063 可明显减少肺组织炎症介质基因表达水平(与缺血再灌注组比较,  $P<0.05$ )。

2.3 肠缺血再灌注后肺组织 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  基因

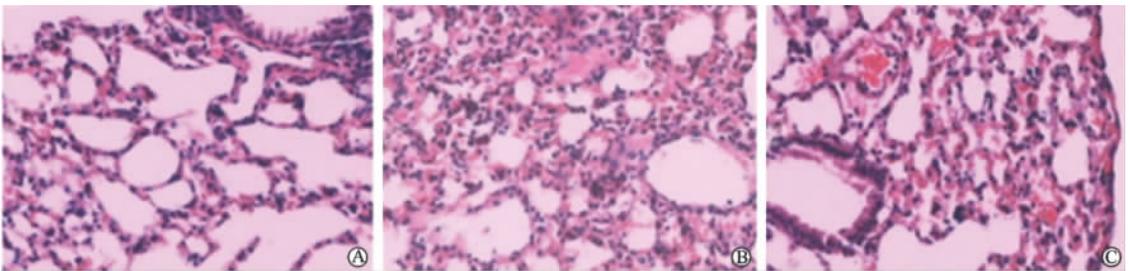


图 2 各组肺组织病理改变

Fig 2 Pulmonary histopathologic change after II/R in each group(H-E staining)

A: Sham group; B: II/R group; C: SB239063 group. Original magnification;  $\times 200$

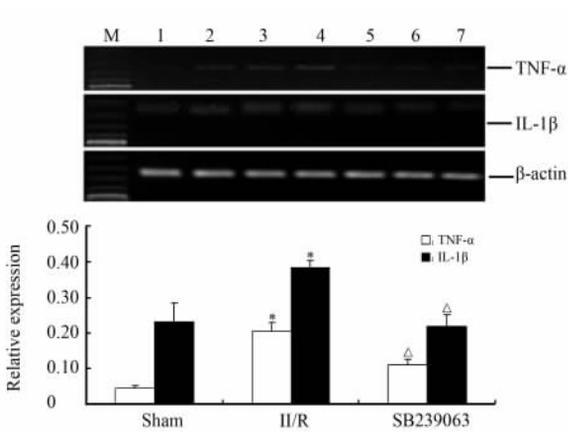


图 3 各组肺组织 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  基因表达的变化

Fig 3 TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA expression in lung tissue after II/R by RT-PCR analysis

M: Marker; 1: Sham group; 2-4: II/R groups; 5-7: SB239063 groups. \*  $P<0.05$  vs sham group; Δ  $P<0.05$  vs II/R group;  $n=6$ ,  $\bar{x}\pm s$

### 3 讨论

肠缺血再灌注引起局部及全身远隔器官、特别是肺炎症反应,在启动全身炎症反应综合征及多器官功能衰竭中起重要作用。目前的研究认为其发病机制与以下因素有关:肠损伤后肠黏膜屏障受损及功能下降促使肠道细菌及内毒素移位,中性粒细胞活化、氧自由基和各种促炎性细胞因子或化学因子的合成及释放<sup>[8]</sup>,但其发病的分子机制尚未完全阐明。

丝裂原活化蛋白激酶是包括 p38 MAPK、细胞外信号调节激酶和 c-Jun 氨基末端调节激酶一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,其中 p38 MAPK 信号通路在调节机体应激和炎症反应方面具有重要作用,损伤、感染和氧化应激等多种因素激活 p38

MAPK 进入细胞核直接作用或者进一步活化细胞核内 NF- $\kappa$ B, 启动细胞内 p38 MAPK 信号转导通路活化, 参与炎症反应和组织损伤<sup>[9]</sup>。缺血再灌注肠损伤同样产生大量脂多糖、氧自由基和炎性细胞因子, 推测这些因素随全身血液循环进入肺组织可能导致 p38 MAPK 被过度激活, 造成肺组织炎症反应及组织损伤。本实验结果证实, 肠缺血再灌注 6 h, 肺组织 p38 MAPK 活化水平明显升高。

为进一步探讨 p38 MAPK 活化在肠缺血再灌注肺损伤的作用机制, 本实验使用新型的第 2 代 p38 抑制剂 SB239063, 它比常用的 SB203580 和 SB202190 特异性及活性更强, 其作用原理是 SB239063 与 p38 MAPK ATP 位点结合竞争性抑制 p38 激酶, 从而使其失去活性, 但是高浓度的 SB239063 也能非特异性抑 JNK 等其他蛋白激酶<sup>[10]</sup>, 使用较低剂量的 SB239063 (1~3 mg/kg) 能有效抑制 p38 MAPK 活性而不影响 JNK 活化<sup>[7]</sup>。本实验选择术前 1 h 使用 SB239063 (3 mg/kg), 蛋白印迹结果表明该剂量可有效抑制肠缺血再灌注后肺组织 p38 MAPK 活化, 同时减轻肺损伤, 以上试验结果初步表明, p38 MAPK 活化参与了肠缺血再灌注后肺损伤的发生。

TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  被认为是激活细胞级联反应的主要促炎性介质, 它们在参与炎症反应及组织损伤的病理生理过程中起重要作用。既往研究表明, 在脓毒症、严重烧伤引起的肺损伤<sup>[5-6]</sup>, 应激性胃溃疡<sup>[7]</sup>, 肠、脑及肝缺血再灌注损伤<sup>[3-4, 10-11]</sup>等多种活体动物实验中, 虽然使用 p38 MAPK 抑制剂的剂型、剂量各有不同, 但抑制 p38 MAPK 活化确实能明显减少全身或局部组织炎症因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等的产生, 对脏器有确切的保护作用。本实验结果显示, SB239063 预处理可明显降低肠缺血再灌注 6 h 后肺脏 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  基因转录水平, 与以上文献报道基本一致, 说明抑制 p38 MAPK 信号转导通路从基因水平减轻肠缺血再灌注肺组织促炎细胞因子合成, 可能进一步降低中性粒细胞活化<sup>[7]</sup>, 继而预防肺组织过度炎症反应及减轻肺损伤。

本实验初步阐明 p38 MAPK 信号活化在肠缺血再灌注肺损伤中的作用, 抑制 p38 MAPK 降低肺部分促炎性细胞因子基因转录水平, 减轻肠缺血再

灌注引起的肺损伤。至于肠缺血再灌注如何导致肺组织 p38 MAPK 信号转导通路活化有待于进一步研究。

## [参考文献]

- [1] Harward T R, Brooks D L, Flynn T C, Seeger J M. Multiple organ dysfunction after mesenteric artery revascularization [J]. *J Vasc Surg*, 1993, 18: 459-469.
- [2] Kumar S, Boehm J, Lee J C. p38 MAP kinases: key signaling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2: 717-726.
- [3] 刘永芳, 刘先义, 刘志刚, 丰新民, 王 锋. p38 丝裂原活化蛋白激酶在肠缺血再灌注损伤大鼠炎性反应中的作用 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2007, 27: 839-841.
- [4] Zheng S Y, Fu X B, Xu J G, Zhao J Y, Sun T Z, Chen W. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase may decrease intestinal epithelial cell apoptosis and improve intestinal epithelial barrier function after ischemia-reperfusion injury [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 656-660.
- [5] Asaduzzaman M, Wang Y, Thorlacius H. Critical role of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in septic lung injury [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36: 482-488.
- [6] 陈旭林, 夏照帆, 韦 多, 贲道锋, 王广庆, 唐洪泰. p38 丝裂原活化蛋白激酶在烧伤大鼠急性肺损伤中的作用机制 [J]. *中华烧伤杂志*, 2004, 20: 262-264.
- [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] Mallick I H, Yang W, Winslet M C, Seifalian A M. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury [J]. *Dig Dis Sci*, 2004, 49: 1359-1377.
- [9] 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.
- [10] Barone F C, Irving E A, Ray A M, Lee J C, Kassis S, Kumar S, et al. SB239063, a second-generation p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, reduces brain injury and neurological deficits in cerebral focal ischemia [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 296: 312-321.
- [11] Kobayashi M, Takeyoshi I, Yoshinari D, Matsumoto K, Morishita Y. p38 Mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates ischemia-reperfusion injury of the rat liver [J]. *Surgery*, 2002, 131: 344-349.

[本文编辑] 孙 岩