

本文引用: 蒙国光, 程巍巍, 张宇新. p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂对急性重症胰腺炎大鼠神经元的保护作用 [J]. 新乡医学院学报, 2016, 33(1): 23-25. DOI: 10.7683/xyxyxb. 2016. 01. 007.

### 【基础研究】

## p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂对急性重症胰腺炎大鼠神经元的保护作用

蒙国光<sup>1</sup>, 程巍巍<sup>1</sup>, 张宇新<sup>2</sup>

(1.唐山市丰润区人民医院普外科,河北 唐山 063000;2.河北联合大学解剖学教研室,河北 唐山 063000)

**摘要:** **目的** 研究 p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂 SB203580 对急性重症胰腺炎(SAP)大鼠神经元的保护作用。**方法** 45 只健康雄性大鼠随机分为对照组、模型组和抑制剂组,每组 15 只。模型组大鼠给予质量分数 5% 牛磺胆酸钠  $2\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,经胰胆管注入胰腺腺体内;抑制剂组大鼠在建模后立即给予腹腔注射 SB203580  $10\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,对照组大鼠开腹后给予等量生理盐水经胰胆管注入胰腺腺体内。术后 24 h 采用免疫组织化学染色和免疫印迹法观察大鼠大脑皮层神经元中磷酸化 p38(p-p38)和 caspase-3 的表达。**结果** 模型组大鼠大脑皮层区 p-p38、caspase-3 阳性神经元数( $21.6 \pm 2.5, 33.1 \pm 3.8$ )较对照组( $1.1 \pm 0.6, 2.0 \pm 0.5$ )显著增加( $P < 0.05$ );抑制剂组大鼠大脑皮层区 p-p38、caspase-3 阳性神经元数( $15.3 \pm 1.3, 16.6 \pm 1.4$ )较模型组显著减少( $P < 0.05$ )。**结论** p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂 SB203580 通过抑制 p38 信号通路下调 caspase-3 表达,从而对 SAP 大鼠神经元起到保护作用。

**关键词:** 急性重症胰腺炎;脑损伤;p38 信号通路;p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂;caspase-3;凋亡;大鼠

中图分类号: R576 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2016)01-0023-03

# Effect of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor on nerve protection of rats with severeacute pancreatitis

MENG Guo-guang<sup>1</sup>, CHENG Wei-wei<sup>1</sup>, ZHANG Yu-xin<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, the People's Hospital of Fengrun Area in Tangshan City, Tangshan 063000, Hebei Province, China; 2. Department of Anatomy, Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei Province, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 on nerve protection of rats with severe acute pancreatitis(SAP). **Methods** Forty-five healthy male rats were randomly divided into control group,model group and inhibitor group,with 15 cases in each group. The model group was induced by retrograde bile-pancreatic duct infusion of 5% sodium taurocholate(2 mg · kg<sup>-1</sup>). The inhibitor group was induced by intraperitoneal injection SB203580 (10 mg · kg<sup>-1</sup>)after modeling. The control group was infused 0.9% sodium chloride by retrograde bile-pancreatic duct. Caspase-3 and phosphorylation of p38(p-p38) were detected to observe the changes of positive cell numbers and the expression level in the cerebral cortical of the rats by immunohistochemistry and Western blot. **Results** The positive cell number of p-p38 and caspase-3(21.6 ± 2.5,33.1 ± 3.8)in the the cerebral cortex increased significantly in the rats of model group compared with those in control group(1.1 ± 0.6,2.0 ± 0.5)(*P* < 0.05),which were reduced significantly in the rats of inhibitor group (15.3 ± 1.3,16.6 ± 1.4) compared with those in model group(*P* < 0.05). **Conclusion** p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 may play a neural protection effect through inhibition of p38 signaling pathway to inhibiting caspase-3 expression down.

**Key words:** severe acute pancreatitis; brain damage; p38 signaling pathway; p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor; caspase-3; apoptosis; rat

急性重症胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 是临床常见的危及患者生命的急腹症, 可以引起胰外多个脏器功能损伤<sup>[1]</sup>, 其中关于脑损伤的研究得到密切关注<sup>[24]</sup>。研究发现, 细胞凋亡存在于 SAP 患者大脑神经元变性丢失过程中<sup>[5]</sup>。p38 通路

是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路之一,在多种应激条件下被激活,对细胞凋亡起调控作用<sup>[6-8]</sup>。本研究制作大鼠 SAP 模型,观察动物模型大脑皮层磷酸化 p38(p-p38)、caspase-3 的表达,以及给予 p38MAPK 抑制剂 SB203580 后对上述指标的影响,探讨 SB203580 对 SAP 大鼠神经元的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康雄性 Sprague Dawley 大鼠 45

DOI:10.7683/xxvxyxb.2016.01.007

收稿日期:2015-07-13

基金项目:唐山市科学技术研究与发展计划项目(编号:111302069a)

作者简介:蒙国光(1979-),男,河北唐山人,硕士,主治医师,研究方向:急腹症的诊断和治疗。

只,体质量 280 ~ 320 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXX(京)2007-2008],自由进食和饮水,室温(25 ± 2)℃,单笼喂养,自然光照。

**1.2 药品及试剂** 质量分数 5% 牛磺胆酸钠、SB203580(美国 Sigma 公司),兔抗鼠 p-p38 多克隆抗体(北京博奥森生物科技有限公司),兔抗鼠 caspase-3 多克隆抗体、浓缩型免疫组织化学超敏 UltraSensitive 试剂盒(福州迈新生物科技开发有限公司)。

**1.3 方法**

**1.3.1 动物分组及处理** 45 只大鼠随机分为对照组、模型组和抑制剂组 3 组,每组 15 只。模型组大鼠 SAP 模型参照 LANKISCH 等<sup>[9]</sup>方法制备(质量分数 5% 牛磺胆酸钠 2 mg · kg<sup>-1</sup>,经胰胆管内注入胰腺腺体内);抑制剂组大鼠在建模后立即给予腹腔注射 SB203580 10 mg · kg<sup>-1</sup>。对照组大鼠开腹后给予等量生理盐水经胰胆管内注入胰腺腺体内;术后 24 h,3 组随机各选取 10 只大鼠,麻醉后断头取脑,生理盐水清洗,置 300 g · L<sup>-1</sup> 蔗糖溶液中固定 48 h,按照大鼠脑立体定位图谱定位,应用恒冷箱冷冻切片机自视神经交叉处向后连续冠状切片(片厚 10 μm),载玻片固定备用。

**1.3.2 免疫组织化学染色** 取脑组织切片室温放置 30 min,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS),pH(7.4 ± 0.2)洗涤 3 次;加入过氧化氢阻断内源性过氧化物酶;正常非免疫兔血清室温孵育 10 min;同一组织相邻切片分别加入兔抗鼠 p-p38 多克隆抗体(1 : 100)、兔抗鼠 caspase-3 多克隆抗体(1 : 100),4℃过夜;PBS 洗涤后,加入生物素标记二抗体室温孵育 20 min;PBS 洗涤,生物素标记室温孵育 20 min,二氨基联苯胺(diaminobezidin, DAB)显色,中性树胶封片,光镜下观察照相。结果判定:将在神经元胞质中出现棕黄色颗粒或着色为棕黄判

定为阳性结果,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。采用 CMIAS 真彩色医学图像免疫组织化学自动分析系统进行阳性细胞计数。3 组中每只大鼠随机选取 3 张脑切片,其数值相加后取平均值。

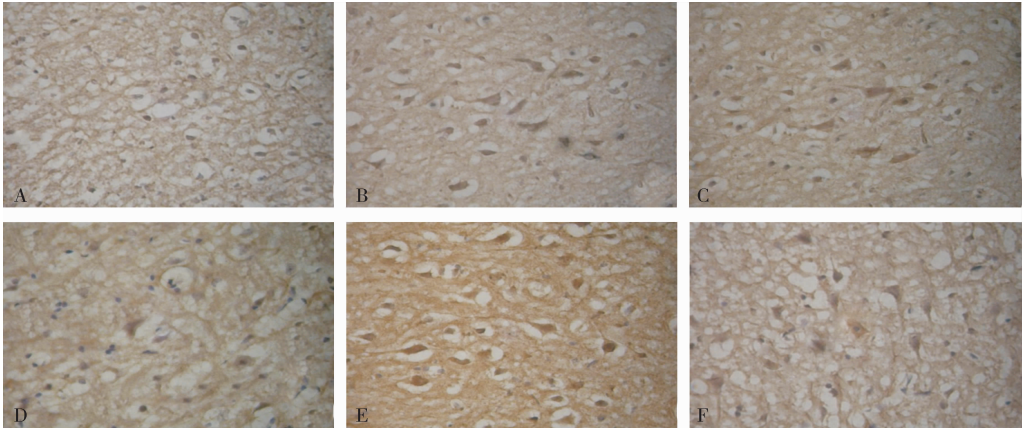
**1.3.3 免疫印迹** 取大鼠大脑皮层,低温匀浆,12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min,取上清,每组取 30 μg 样品电泳,转膜,封闭,然后加入兔抗鼠 caspase-3 多克隆抗体(1 : 400)和兔抗鼠 p-p38 多克隆抗体(1 : 100)孵育,4℃过夜,再加入生物素标记的二抗(1 : 200)室温孵育,加入辣根过氧化物酶复合物,DAB 显色。以 β-actin 作为内参,扫描条带,在同一条件下应用 CMIAS 真彩医学图像分析系统(北京航空航天大学)测定条带积分光密度值。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用方差分析,相关性分析采用简单线性相关分析法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 3 组大鼠胰腺组织大体观察** 对照组大鼠胰腺组织未见明显异常改变。模型组大鼠胰腺肿胀明显,腺体表面呈局灶或片状出血坏死;腹腔内可见大片皂化斑、脂肪坏死及大量血性腹水,提示 SAP 造模成功。抑制剂组大鼠胰腺改变较模型组明显减轻。

**2.2 3 组大鼠大脑皮层区 p-p38 和 caspase-3 免疫组织化学染色结果及相关性分析** 结果见图 1、表 1。与对照组比较,模型组大鼠大脑皮层组织神经元缺失明显,细胞间纤维稀疏;p-p38、caspase-3 阳性表达显著增多( $P < 0.05$ ),细胞着色加深。与模型组比较,抑制剂组大鼠大脑皮层组织神经元丢失程度减轻,p-p38、caspase-3 阳性表达显著减少( $P < 0.05$ )。相关性分析结果显示,大鼠大脑皮层组织 p-p38 与 caspase-3 阳性表达水平存在正相关关系( $r = 0.475, P < 0.05$ )。



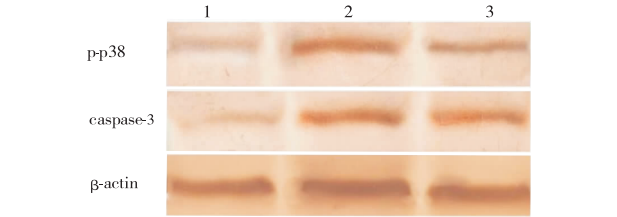
A: 对照组 p-p38; B: 模型组 p-p38; C: 抑制剂组 p-p38; D: 对照组 caspase-3; E: 模型组 caspase-3; F: 抑制剂组 caspase-3。  
图 1 3 组大鼠大脑皮层组织 p-p38 和 caspase-3 的表达(免疫组织化学染色, × 400)  
Fig.1 Expression of p-p38 and caspase-3 in the cerebral cortex of rats in the three groups (immunohistochemical staining, × 400)

表 1 3 组大鼠大脑皮层组织 p-p38 和 caspase-3 阳性细胞数  
Tab.1 Positive cells number of p-p38 and caspase-3 in the cerebral cortex of rats in the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | n  | p-p38                    | caspase-3                |
|------|----|--------------------------|--------------------------|
| 对照组  | 10 | 1.1 ± 0.6                | 2.0 ± 0.5                |
| 模型组  | 10 | 21.6 ± 2.5 <sup>a</sup>  | 33.1 ± 3.8 <sup>a</sup>  |
| 抑制剂组 | 10 | 15.3 ± 1.3 <sup>ab</sup> | 16.6 ± 1.4 <sup>ab</sup> |

注:与对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

2.3 3 组大鼠大脑皮层组织 p-p38 和 caspase-3 免疫印迹法检测结果 结果见图 2、表 2。在预染蛋白标准相对分子质量 38 000、32 000 处,分别可见 p-p38 和 caspase-3 特异性蛋白条带。灰度分析结果:与对照组比较,模型组 p-p38、caspase-3 蛋白水平显著升高,蛋白条带最宽,着色最深,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,抑制剂组 p-p38、caspase-3 蛋白水平显著下降,蛋白条带变窄、着色变浅,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



1:对照组;2:模型组;3:抑制剂组。

图 2 3 组大鼠大脑皮层组织 p-p38 和 caspase-3 免疫印迹检测  
Fig.2 Western blotting of p38 and caspase-3 in the cerebral cortex of rats in the three groups

表 2 3 组大鼠大脑皮层组织 p-p38 和 caspase-3 蛋白积分光密度值比较

Tab.2 Integral optical density value comparison of p-p38 and caspase-3 protein in the cerebral cortex of rats among the the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | n  | p-p38                   | caspase-3               |
|------|----|-------------------------|-------------------------|
| 对照组  | 10 | 2.1 ± 0.4               | 4.2 ± 0.5               |
| 模型组  | 10 | 18.7 ± 2.3 <sup>a</sup> | 16.2 ± 1.0 <sup>a</sup> |
| 抑制剂组 | 10 | 6.0 ± 1.2 <sup>ab</sup> | 7.5 ± 2.8 <sup>ab</sup> |

注:与对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

3 讨论

SAP 病情危重而复杂,并发症多且严重,脑损伤是其比较严重的并发症之一,临床表现为一系列神经功能障碍,早期诊断困难,治疗效果差<sup>[10]</sup>。研究发现,细胞凋亡在 SAP 脑损伤的发病过程起重要作用<sup>[11]</sup>。Caspase-3 作为细胞凋亡的执行者,在大脑神经元的变性中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。为了明确 SAP 大鼠神经元是如何丢失的,本实验应用质量分数 5% 牛磺胆酸钠诱导复制 SAP 大鼠模型,观察大鼠大脑皮层 caspase-3 表达,结果发现,与对照组比较,模型组大鼠大脑皮层区 caspase-3 阳性神经元显著增多,同时蛋白水平也显著升高,并且神经元缺失明显。提示细胞凋亡可能与 SAP 神经元的变性丢失有关,但具体机制不祥。本研究结果发现,caspase-3 参与了 SAP 脑损伤

神经元凋亡,故寻找其上游信号通路调控因子,为 SAP 脑损伤后神经元的保护提供新的途径。研究发现,p38MAPK 通路参与神经元的存活与凋亡<sup>[13-14]</sup>,具体机制未明确。为此,本研究探讨 p38MAPK 通路是否参与调控 caspase-3 的表达,对神经元的变性丢失产生保护作用。结果发现,模型组大鼠大脑皮层神经元丢失明显,p-p38 及 caspase-3 阳性神经元增多,且二者存在正相关关系,表达具有一致性。在给予 SB203580 后,大鼠神经元丢失程度减轻,p-p38 及 caspase-3 阳性神经元减少,且蛋白水平明显下降。提示 p38MAPK 通路是通过介导 caspase-3 的表达导致神经元变性丢失,但经 SB203580 抑制该通路后神经元丢失程度减轻。综上所述,p38MAPK 通路对于 SAP 大鼠神经元 caspase-3 表达起调控作用,阻断该通路后能够减轻脑损伤,该发现为临床治疗 SAP 脑损伤提供了新途径。

参考文献:

[1] SZENTKERESZTY Z,CSISZKÓ A. Abdominal compartment syndrome in severe acute pancreatitis-literature review[J]. *Magy Seb*, 2012,65(1):9-13.

[2] SHARMA V,SHARMA R,RANA S S,*et al.* Pancreatic encephalopathy: an unusual cause of asterixis[J]. *JOP*,2014,15(4):383-384.

[3] BARTHA P,SHIFRIN E,LEVY Y. Pancreatic encephalopathy-a rare complication of a common disease[J]. *Eur J Intern Med*, 2006,17(5):382.

[4] ZHANG X P,TIAN H. Pathogenesis of pancreatic encephalopathy in severe acute pancreatitis[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007,6(2):134-140.

[5] 袁伟燕,肖明兵,黄华,等. 重症急性胰腺炎大鼠海马 NF-κB 与 caspase-3 的表达[J]. *江苏医药*,2012,38(17):2015-2017.

[6] SUI X,KONG N,YE L,*et al.* p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents[J]. *Cancer Lett*,2014,344(2):174-179.

[7] OSTRAND-ROSENBERG S,SINHA P,CHORNOGUZ O,*et al.* Regulating the suppressors:apoptosis and inflammation govern the survival of tumor-induced myeloid-derived suppressor cells (MD-SC)[J]. *Cancer Immunol Immunother*,2012,61(8):1319-1325.

[8] CHUNG K F. p38 mitogen-activated protein kinase pathways in asthma and COPD[J]. *Chest*,2011,139(6):1470-1479.

[9] LANKISCH P G,IHSE I. Bile-induced acute experimental pancreatitis[J]. *Scand J Gastroenterol*,1987,22(3):257-260.

[10] ZHANG X P,TIAN H. Pathogenesis of pancreatic encephalopathy in severe acute pancreatitis[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007,6(2):134-140.

[11] WEIS S,SCHLAICH T C,DEHGHANI F,*et al.* p8 deficiency causes siderosis in spleens and lymphocyte apoptosis in acute Pancreatitis[J]. *Pancreas*,2014,43(8):1277-1285.

[12] SNIGDHA S,SMITH E D,PRIETO G A,*et al.* Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death[J]. *Neurosci Bull*,2012,28(1):14-24.

[13] BROWN G C. Nitric oxide and neuronal death[J]. *Nitric Oxide*, 2010,23(3):153-165.

[14] MILOSO M,SCUTERI A,FOUDAH D,*et al.* MAPKs as mediators of cell fate determination:an approach to neurodegenerative diseases[J]. *Curr Med Chem*,2008,15(6):538-548.

( 本文编辑:王 燕 英文编辑:王 燕 )