

大鼠重症急性胰腺炎发病机制中 p38 丝裂原活化蛋白激酶的作用

施新岗, 李兆申, 贾一韬, 许永春, 满晓华, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭

施新岗, 李兆申, 贾一韬, 许永春, 满晓华, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭. 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科 上海市 200433
施新岗, 男, 1970-02-22 生, 江苏省启东市人, 汉族, 2004 年第二军医大学博士, 主治医师, 主要从事重症急性胰腺炎发病机制和治疗研究
项目负责人: 李兆申, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科. zhsl@81890.net
电话: 021-25070585
收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-10-11

p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in pathogenesis of severe acute pancreatitis in rats

Xin-Gang Shi, Zhao-Shen Li, Yi-Tao Jia, Yong-Chun Xu, Xiao-Hua Man, Yan-Fang Gong, Zhen-Xing Tu, Guo-Ming Xu

Xin-Gang Shi, Zhao-Shen Li, Yi-Tao Jia, Yong-Chun Xu, Xiao-Hua Man, Yan-Fang Gong, Zhen-Xing Tu, Guo-Ming Xu, Department of Gastroenterology of Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Correspondence to: Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, 174 Changhai Lu, Shanghai 200433, China. zhsl@81890.net
Received: 2004-08-17 Accepted: 2004-10-11

Abstract

AIM: To study the dynamic changes of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) phosphorylation and to assess the effect of p38 MAPK phosphorylation inhibitor in severe acute pancreatitis (SAP) in rats.

METHODS: The SAP model was induced by bili-pancreatic duct retrograde infusion with 5% sterile sodium taurocholate solution. Eighty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham-operation (SO) group ($n=30$), SAP-NS group ($n=25$) and SAP-CNI1493 group ($n=25$). In the SAP-CNI1493 group, SD rats were administered with 10 mg/kg inhibitor CNI-1493 (i.v.) 30 min before induction of SAP. In SAP-NS group, rats received same volume isotonic saline (i.v.) as CNI-1493. Pancreatic tissues and serum samples were collected before and 15 min, 0.5 h, 1 h, 3 h, 6 h after operation. Western blot analysis was performed to determine the phosphorylations of p38 MAPK in the pancreas homogenates. Serum levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured by ELISA; Pathological changes of pancreas were examined and scored with light microscopy.

RESULTS: In the SO group, basal p38 MAPK phosphorylation was detected. In the SAP-NS group, the p38 MAPK phosphorylation in the pancreas homogenates reached the maximum at 15 min, remained at a similar level at 30, 60 and 180 min, and declined to the same level as that in SO group at 6 h. In the SAP-NS group and SAP-CNI1493 group, the densities of the band detected by Western blot were $5\ 200\pm360$, $3\ 500\pm250$ at 15 min, and $4\ 910\pm320$, $2\ 500\pm340$ at 30 min ($P<0.01$). In SAP-CNI1493 group, the serum levels of IL-1 β and TNF- α were decreased significantly as compared with those in SAP-NS group ($P<0.01$). The severity of tissue damage in the SAP-CNI1493 group at 3 h were significantly attenuated in comparison with that of the SAP-NS group ($P<0.01$).

CONCLUSION: The p38 MAPK plays an important role in the pathogenesis of SAP. Inhibition of p38 MAPK phosphorylation may be a potential approach for prevention and treatment of SAP.

Key Words: p38 MAPK; Severe acute pancreatitis; Phosphorylations

Shi XG, Li ZS, Jia YT, Xu YC, Man XH, Gong YF, Tu ZX, Xu GM. p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in pathogenesis of severe acute pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(5):653-656

摘要

目的: 研究 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号转导通路在大鼠重症急性胰腺炎(SAP)胰腺组织中的变化规律, 探讨 p38 MAPK 特异性抑制剂 CNI1493 对 SAP 的保护作用。

方法: 50 g/L 牛磺胆酸钠胰胆管逆行注射建立雄性 SD 大鼠 SAP 模型, 随机分为 SO 组(假手术组, $n=30$)、SAP-NS 组($n=25$)及 SAP-CNI1493 组($n=25$), 各组大鼠质量相似。Western blot 法检测大鼠胰腺组织磷酸化 p38 MAPK 的表达; ELISA 方法检测血清 IL-1 β , TNF- α 水平; 光镜下评估胰腺组织病理学积分。

结果: SO 组胰腺组织存在磷酸化 p38 MAPK 弱表达, SAP-NS 组造模后 15 min 时磷酸化 p38 MAPK 的表达即显著增高至峰值, 3 h 后开始下降, 6 h 时磷酸化 p38

MAPK 活性与 SO 组相似。SAP-NS 组和 SAP-CNI1493 组 Western blot 检测 15, 30 min 条带光密度值 5200 ± 360 , 3500 ± 250 和 4910 ± 320 , 2500 ± 340 , SAP-CNI1493 组 15, 30 min 时胰腺组织磷酸化 p38 MAPK 的表达显著低于 SAP-NS 组 ($P < 0.01$)。SAP-CNI1493 组 3, 6 h 时间点血清 IL-1 β , TNF- α 水平及 3 h 时间点胰腺组织病理学积分均显著低于 SAP-NS 组 ($P < 0.01$)。

结论: p38 MAPK 信号转导通路与牛磺胆酸钠大鼠 SAP 发病机制有关, CNI1493 预处理可能通过抑制 p38 MAPK 的激活、减少炎症细胞因子的产生而改善胰腺炎病理改变的严重程度。

关键词: p38 丝裂原活化蛋白激酶;重症急性胰腺炎;磷酸化

施新岗, 李兆申, 贾一韬, 许永春, 满晓华, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭. 大鼠重症急性胰腺炎发病机制中 p38 丝裂原活化蛋白激酶的作用. 世界华人消化杂志 2005;13(5):653-656

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/653.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎 (SAP) 因其常可并发全身炎症反应综合征 (SIRS)、全身多脏器功能障碍 (MOF) 及死亡率高, 达 10-30% 而一直是学者们的研究热点。近年来信号转导通路在发病机制中的意义更是引起人们的兴趣, 已经有研究显示蛙皮素大鼠轻症急性胰腺炎 (MAP) 造模后早期胰腺组织 p38MAPK 即大量磷酸化活化, 而 p38MAPK 特异性抑制剂能改善胰腺炎病变的严重程度^[1-2]。本研究检测 50 g/L 牛磺胆酸钠胆胰管内逆行注射诱导大鼠 SAP 模型胰腺组织 p38MAPK 磷酸化活化水平, 探讨 p38MAPK 信号转导通路特异性抑制剂 CNI-1493 对 SAP 的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 SD 大鼠 80 只, 清洁级, δ , 质量 250-300 g, 购自第二军医大学实验动物中心, 本实验室适应性饲养 1 wk 开始实验, 大鼠造模前禁食 12 h, 自由饮水。牛磺胆酸钠 (Sigma 公司); 胞质蛋白试剂盒 (NE-PER Pierce 公司); p38MAPK 抑制剂 CNI-1493 (美国 Pennsylvania 州 Cruz 博士惠赠); 大鼠血清 IL-1 β , TNF- α ELISA 检测试剂盒 (上海增健生物科技公司); p38MAPK 磷酸化单克隆一抗 (Cell Signaling Technology 公司); 山羊抗小鼠 IgG-HRP 二抗 (Immuclob Labs. Inc. CA. USA); ECL 试剂盒 (LumiGLO Chemiluminescent Substrate, Lake Placid, NY)。实验前 2 h 禁水。随机分为假手术组 (SO 组, $n = 30$)、SAP 生理盐水干预对照组 (SAP-NS 组, $n = 25$) 及 SAP-CNI1493 干预组 (SAP-CNI1493 组, $n = 25$), SO 组分 0 (正常对照组), 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 每时间点 5 只;

SAP-NS 组及 SAP-CNI1493 组分造模后 15, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 每时间点 5 只。30 g/L 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 以 4 号加工钝头静脉针逆行穿刺十二指肠前壁、通过十二指肠乳头插入胆胰管远端, 分别在近肝门及胆胰管十二指肠开口处动脉夹将胆胰管两端钳闭, 以 0.2 mL/min 速度注入 5% 牛磺胆酸钠 (1 mL/kg)。SO 组开腹后仅翻动十二指肠并触摸胰腺数次, SAP-CNI1493 组于造模前 30 min, 尾静脉注入 CNI-1493 (10 mg/kg), SAP-NS 组注入相同体积的双蒸水。各时间点腹主动脉取血处死大鼠, 并迅速取胰腺组织。

1.2 方法 常规石蜡包埋, 在不同平面切取两张切片行 HE 染色, 由专科医师光镜下观察胰腺组织病理变化, 参照 Rongione *et al* (Gastroenterology 1997; 112:960) 标准进行评分。血清 TNF- α 、IL-1 β 的测定采用 ELISA 方法测定。胰腺组织 100 mg 剪碎后于液氮中研磨, 按照操作说明抽提胞质蛋白, 蛋白定量采用 BCA 法。取 40 μ g 样品常规进行 SDS-PAGE 电泳后, 电转移至硝酸纤维素薄膜, 50 g/L 脱脂奶粉的 1 \times TBST 溶液室温封闭。第一抗体为磷酸化 p38MAPK mAb, 第二抗体为山羊抗小鼠 IgG-HRP。ECL 显色, 照片在 Fluors Mutilmager 图像分析仪 (BioRad 公司) 上用 Quantity One 4.1 版图像分析软件进行分析, 以相应蛋白条带的平均光密度值来表示 p38MAPK 磷酸化活化水平的相对强度。

统计学处理 所有数据以 mean \pm SD 表示。通过 SPSS 11.0 统计软件, 采用单因素方差分析对各组均数进行显著性检验, $P < 0.05$ 具有显著性差异。

2 结果

2.1 血清 TNF- α 、IL-1 β 水平 SO 组血清 TNF- α , IL-1 β 水平在 0, 3 h 及 6 h 无显著性变化, 均低于其他组 ($P < 0.01$); SAP-NS 组及 SAP-CNI1493 组血清 TNF- α , IL-1 β 水平随造模后时间的延长而逐渐升高, 其中 SAP-CNI1493 组各时间点 TNF- α , IL-1 β 水平均显著低于 SAP-NS 组 ($P < 0.01$, 表 1)。

2.2 胰腺组织病理学评分 SO 组胰腺组织结构清晰, 腺泡小叶完整、无坏死、间质水肿和炎症细胞浸润。SAP-NS 组 3 h 时间点胰腺组织可见间质水肿, 小叶间隙增大, 残余腺泡肿胀; 并可见片状出血坏死和腺泡小叶结构破坏, 坏死区周围有大量的嗜中性白细胞及单核细胞等炎症细胞浸润。SAP-CNI1493 组 3 h 时间点胰腺组织水肿、炎症、出血、坏死积分及总积分显著降低 ($P < 0.01$ vs SAP-NS group, 表 2)。

2.3 胰腺组织 p38MAPK 磷酸化 SO 组大鼠胰腺组织中检测到少量磷酸化 p38MAPK 的表达; SAP-NS 组造模后 15 min 磷酸化 p38MAPK 的表达即显著增高至峰值, 维持 3 h 后显著下降 ($P < 0.05$), 6 h 时磷酸化 p38MAPK

表1 SAP大鼠血清 TNF- α , IL-1 β 水平 (mean \pm SD, ng/L)

分组	TNF- α			IL-1 β		
	0	3 h	6 h	0	3 h	6 h
SO	60.3 \pm 15.2	65.8 \pm 20.5	66.3 \pm 21.2	90.3 \pm 20.2	85.8 \pm 25.5	95.3 \pm 27.2
SAP-NS		286.5 \pm 50.3 ^b	500.5 \pm 45.3 ^b		293.8 \pm 46.3 ^b	388.0 \pm 44.5 ^b
SAP-CNI1493		188.4 \pm 31.2	355.5 \pm 40.2		200.6 \pm 27.3	270.7 \pm 31.8

^b $P<0.01$ vs SO, SAP-NS group.表2 SAP 3 h大鼠胰腺组织病理学积分 (mean \pm SD, $n=5$)

分组	水肿	炎症	出血	坏死	总积分
SAP-NS	3.3 \pm 0.2	2.3 \pm 0.2	1.6 \pm 0.1	2.7 \pm 0.2	9.9 \pm 0.4
SAP-CNI1493	2.7 \pm 0.2 ^b	1.8 \pm 0.2 ^b	1.1 \pm 0.2 ^b	1.9 \pm 0.3 ^b	7.5 \pm 0.3 ^b

^b $P<0.01$ vs SAP-NS group.

的表达与SO组相似($P>0.05$). 15 min及30 min时SAP-CNI1493组胰腺组织中磷酸化p38MAPK的表达显著低于SAP-NS组相应时间点($P<0.01$, 表3).

3 讨论

近年来丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路在SAP发病机制中的作用日益引起研究者的重视, 其中p38MAPK是最主要、研究最深入的MAPK家族成员之一, 在机体应激和炎症反应调控过程中有极其重要的作用^[3-5], p38MAPK信号转导通路可与NF- κ B通路在下游聚合^[6-8], 调控TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、E-选择素的产生. p38MAPK的激活在急性胰腺炎(AP)发生、发展起着极其重要的作用, Wagner *et al* (Digestion 1999;60:41)在雨蛙素MAP模型上发现, 造模后胰腺细胞的p38MAPK活性迅速升高, 30 min时活性达到峰值, 120 min时p38MAPK降至基础活性. Dabrowski *et al*^[9]发现活性氧(ROS)可以显著激活MAP胰腺腺泡细胞内p38MAPK.

目前对p38 MAPK在AP发病机制中作用的研究主要集中于MAP模型和离体胰腺炎模型上, 对于具有更重要意义的SAP还缺乏系统的研究. 我们利用SAP大鼠模型, 发现SO组胰腺组织中能检测到磷酸化p38MAPK的弱表达, 造模后15 min时p38MAPK的表达即显著

增高至峰值, 维持较高水平3 h后开始下降, 6 h时磷酸化p38MAPK的表达与SO组相似. SO组胰腺组织中存在磷酸化p38MAPK的基础表达, 说明p38MAPK信号转导通路可能参与调节胰腺腺泡细胞的基础生理活动, 是机体在基础应激状态下就活化的信号转导通路;造模后早期胰腺组织的p38MAPK即显著活化, 提示p38MAPK信号转导通路在SAP发病的过程中参与了炎症信号转导, 对SAP的发生、发展可能具有重要的意义;SAP病理过程中p38MAPK活化维持较高水平的时间, 而且贯穿于胰腺炎整个早期病理过程, 长于以往研究报道的MAP模型中的维持较高活化水平时间^[1-2], 从细胞信号转导水平上揭示了MAP和SAP发病机制可能存在差异. p38MAPK持续的激活可引起炎症细胞因子的不断产生, 而不断产生的炎症因子使炎症反应调控失衡导致级联“瀑布”效应, 并由此导致SIRS、MOF的发生^[10]. 随着对p38MAPK信号转导通路病理生理功能及其在AP发病机制中作用研究的不断加深, 已经证实p38MAPK信号转导通路可以作为MAP时抗炎治疗的靶点, 抑制p38MAPK能够发挥有效的抗炎作用, 减少细胞因子、炎症递质等释放, 减轻胰腺腺泡细胞损伤, 明显提高动物的生存率, 并且未发现明显的毒副作用^[11-13]. Blinman *et al*^[14]发现, 体外胰腺炎时胰腺腺泡细胞p38MAPK活性明显升高, 并且与TNF- α , IL-1 β ,

表3 SAP大鼠胰腺组织磷酸化p38MAPK Western blot光密度检测结果 (mean \pm SD, $n=5$)

分组	0	15 min	30 min	1 h	3 h	6 h
SO	1 200 \pm 105	—	—	—	—	—
SAP-NS		5 200 \pm 360 ^b	4 910 \pm 320 ^b	4 300 \pm 230 ^b	3 800 \pm 120 ^b	1 300 \pm 140
SAP-CNI1493		3 500 \pm 250	2 500 \pm 340	—	—	—

^b $P<0.01$ vs SO, SAP-NS group.

IL-6, IL-8, MCP-1 等多种细胞因子及趋化因子的产生有关, 而采用 p38MAPK 的抑制剂如 SB-203580 等能明显抑制上述细胞因子及趋化因子的产生, 抑制程度可达 70-95%, 并且抑制细胞因子及趋化因子的程度与抑制 p38MAPK 的程度成正比. 本研究结果提示 CNI-1493 能抑制炎症细胞因子 IL-1 β , TNF- α 的过度产生, 因此 p38MAPK 的过度激活, 刺激炎症因子的过度激活可能是胰腺炎病理改变的一个重要机制. 本研究提示 p38MAPK 是 SAP 的发病机制中一条重要的信号转导通路, p38MAPK 抑制剂可能通过调控炎症递质和细胞因子的产生而减轻 SAP 的病理改变的严重程度. 但本研究只是一个预防性给药, 着眼点还是在于机制的研究, 而且在本实验中未能分多个时间点和不同剂量、不同用药途径进行研究, 与真正的药理学研究还有一定的差距. 最近 Ge *et al*^[15] 发现并不是 MKK 的蛋白也能调控 MAPK 的激活, 而且对 p38MAPK 在 AP 中的作用还有矛盾的报道, 如 Fleischer *et al*^[2] 的研究发现 p38MAPK 抑制剂 SB203580 干预后出现胰蛋白酶水平升高、病理学上出现 MAP 时不应该出现的明显腺泡细胞坏死. 由于 MAPK 在炎症性疾病中作用的确切的机制仍未清楚, 因此 p38MAPK 信号转导通路活化及其抑制剂对 SAP 作用的具体机制还有待进一步深入和完善.

4 参考文献

- 1 Simeone DM, Zhang L, Graziano K, Nicke B, Pham T, Schaefer C, Logsdon CD. Smad4 mediates activation of mitogen-activated protein kinases by TGF- β in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C311-C319
- 2 Fleischer F, Dabew R, Goke B, Wagner AC. Stress kinase inhibition modulates acute experimental pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2002;8:259-265
- 3 Ren HB, Li ZS, Xu GM, Tu ZX, Shi XG, Jia YT, Gong YF. Dynamic changes of mitogen-activated protein kinase signal transduction in rats with severe acute pancreatitis. *Chin J Dig Dis* 2004;5:123-125
- 4 Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001;81:807-869
- 5 Arbabi S, Rosengart MR, Garcia I, Jelacic S, Maier RV. Priming interleukin 8 production: role of platelet-activating factor and p38. *Arch Surg* 1999;134:1348-1353
- 6 Clifton AD, Young PR, Cohen P. A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAPkinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. *FEBS Lett* 1996;392:209-214
- 7 Janknecht R, Hunter T. Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *EMBO J* 1997;16:1620-1627
- 8 Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, Cohen P, Fiers W. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J* 1996;15:1914-1923
- 9 Dabrowski A, Boguslowicz C, Dabrowska M, Tribillo I, Gabryelewicz A. Reactive oxygen species activate mitogen-activated protein kinases in pancreatic acinar cells. *Pancreas* 2000;21:376-384
- 10 O'Neill S, O'Neill AJ, Conroy E, Brady HR, Fitzpatrick JM, Watson RW. Altered caspase expression results in delayed neutrophil apoptosis in acute pancreatitis. *J Leukoc Biol* 2000;68:15-20
- 11 陈浩, 李非, 程韵枫, 孙家邦. 大鼠重症急性胰腺炎病情演变中中性粒细胞的作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:776-779
- 12 Yan SR, Al-Hertani W, Byers D, Bortolussi R. Lipopolysaccharide-binding protein-and CD14-dependent activation of mitogen-activated protein kinase p38 by lipopolysaccharide in human neutrophils is associated with priming of respiratory burst. *Infect Immun* 2002;70:4068-4074
- 13 English JM, Cobb MH. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:40-45
- 14 Blinman TA, Gukovsky I, Mouria M, Zaninovic V, Livingston E, Pandol SJ, Gukovskaya AS. Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C1993-2003
- 15 Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y, Han J. MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 2002;295:1291-1294

编辑 潘伯荣 审读 张海宁