

银杏苦内酯 B 对重症急性胰腺炎大鼠 p38 丝裂原活化蛋白激酶活性的影响

刘丽荣, 夏时海*, 赵志玲, 邱 瑶

(武警医学院附属医院 消化内科胰腺中心, 天津 300162)

摘要:目的 观察银杏苦内酯 B (BN52021) 对重症急性胰腺炎 (SAP) 大鼠胰腺组织 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 活性的影响。方法 Wistar 雄性大鼠随机分为阴性对照组 (NC 组)、SAP 模型组 (SAP 组)、BN52021 治疗组 (BN 组), 每组按术后不同时相点 (1、2、3、6、12、24 h) 分为 6 小组, 用 Western blotting 法分别检测胰腺组织 p38 MAPK 表达与激活情况, 同时对胰腺组织进行病理学观察和测定血清淀粉酶活性的变化。结果血清淀粉酶和病理学结果显示 SAP 造模成功, BN52021 能降低 SAP 大鼠的血清淀粉酶活性, 病理学评分在 3、6、12 h 较 SAP 组显著降低 ($P < 0.05$); NC 组在各时相点均只检测到少量磷酸化的 p38 MAPK, SAP 组和 BN 组在各时相点均较 NC 组显著升高 ($P < 0.05$), BN 组在 6、12、24 h 较 SAP 组显著降低 ($P < 0.05$)。结论 BN52021 可部分抑制 SAP 大鼠胰腺组织 p38 MAPK 的活化, 从而发挥其治疗作用。

关键词: 胰腺炎; 银杏苦内酯 B (BN52021); p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK)

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)05-0729-04

Effect of ginkgolide B on p38 mitogen-activated protein kinase activity in rat pancreas with severe acute pancreatitis

LIU Li-rong, XIA Shi-hai, ZHAO Zhi-ling, DI Yao

(Department of Gastroenterology, Pancreas Center of Affiliated Hospital of Medical College of the Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of ginkgolide B (BN52021) on p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) activity in rat pancreas with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** One hundred and eighty Wistar male rats were randomly divided into three groups, which included negative contrast group (NC), SAP model group (SAP) and BN52021 treating group (BN). The rats of each group were further randomly divided into six subgroups at different time points including 1, 2, 3, 6, 12, and 24 h. The activities of serous amylase were detected in the rats of every subgroups, and the expression and activation of p38 MAPK in pancreas tissue were detected by Western blotting, and the pathologic change of pancreas was observed by microscope after HE dyeing. **Results** The results of detection of serous amylase and pathology showed that SAP models were successful and BN52021 can depress the activities of serous amylase in SAP group and ameliorate pathological score of pancreas (3, 6, and 12 h, $P < 0.05$) compared to SAP group. In the rat pancreas of the NC group, the slight phosphorylated p38 MAPK can be detected. Compared with the NC group, the activation of p38 MAPK were significantly higher at every time points in the SAP and BN group ($P < 0.05$). In the BN group, the change of p38 MAPK expression and activation synchronized with that of the SAP group, but at 6, 12, and 24 h points, the level of p38 MAPK was significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusion** BN52021 could partly inhibit the activation of p38 MAPK in rat pancreas with SAP and exerts its therapeutic effect.

Key words: pancreatitis; ginkgolide B (BN52021); p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)

重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 病情凶险, 致病因素复杂多样, 发病机制迄今

尚未完全明了, 仍系临床难治性疾病。随着对信号转导通路在其发病机制中的作用的深入研究, 近年发

收稿日期: 2006-07-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300465)

作者简介: 刘丽荣 (1974—), 女, 辽宁盘锦人, 主治医师, 在读硕士研究生。

* 通讯作者 夏时海 Tel: (022) 60578765 Fax: (022) 24370605 E-mail: xshhcx@sina.com

现,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路在 SAP 病程中的作用不容忽视,其中 p38 MAPK 作为应激激活的 MAPK 信号转导通路,在机体炎症反应调控过程中发挥极其重要的作用,该信号通路在炎症反应过程中的主要功能是在转录后水平控制炎症介质基因表达^[1,2]。已有大量体外实验和体内实验证明,胰腺炎时 p38 MAPK 活性明显升高。针对血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)在 SAP 发病机制中的作用,以及 PAF 的信号转导机制,本实验选用天然的 PAF 受体拮抗剂银杏苦内酯 B (BN52021)治疗 SAP 大鼠,主要探讨其对 SAP 大鼠胰腺组织 p38 MAPK 活性的影响,为其治疗 SAP 提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器:BN52021(质量分数 90%)、牛磺胆酸钠(Sigma 公司),淀粉酶试剂盒(北京科美试剂公司),抗 p38 MAPK 抗体、磷酸化 p38 MAPK 抗体(Santa Crus 公司),聚偏二氟乙烯(PVDF 膜)(Millipore 公司),ECL 液(Santa cruze 公司),预染 marker(北京天为时代生物技术有限公司)。DYY-12 电泳仪、电转印仪(北京六一仪器厂),凝胶扫描成像系统(Bio-Rad 公司),垂直电泳仪(Brad-boid 公司)。

1.2 实验动物分组与模型制备:雄性 Wistar 大鼠(军事医学科学院实验动物中心)180 只,随机分为阴性对照组(NC, $n=60$)、SAP 模型组(SAP, $n=60$)和 BN52021 治疗组(BN, $n=60$),3 组按术后不同时相点又随机分为 1、2、3、6、12、24 h 6 个小组,每小组为 10 只。参照 Aho 等^[3]方法制备 SAP 模型,Wistar 大鼠称重,标记,术前 24 h 禁食,自由饮水。0.4% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)ip 麻醉,仰卧位固定后,于上腹正中做 2 cm 切口进入腹腔,找到大鼠的十二指肠和胆胰管后,用无创血管夹夹住胆胰管肝端,用钝头针头经十二指肠浆肌层行胆胰管逆行穿刺术,穿刺成功后,微量注射器逆行胰胆管内注射 5% 牛磺胆酸钠(0.1 mL/100 g),推注速度 0.20 mL/min。推药后用无创血管夹夹住胰胆管入十二指肠处,观察 10 min,去除血管夹,确认腹腔内无活动性出血后,两层关腹并用无菌纱布覆盖伤口,NS 组开腹后仅翻动十二指肠并触摸胰腺数次关腹。BN 组于术后 15 min 股静脉 iv BN52021 (5 mg/kg),BN52021 用二甲亚砜(DMSO)溶解,NC 组、SAP 组股静脉 iv 等量生理盐水。

1.3 标本的采集与保存:各组大鼠分别在术后 1、2、3、6、12、24 h 6 个时相点麻醉大鼠,经右心房取静脉血,37 ℃ 水浴 10 min 后,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液于消毒过的 EP 管中,-20 ℃ 冰箱保存,以备测定血清淀粉酶。同时取一部分胰腺组织放在液氮中过夜后置于 -80 ℃ 冰箱冻存备用,再取一部分胰腺组织,用 40 g/L 中性缓冲甲醛固定,石蜡包埋切片后 HE 染色制片,进行病理学观察和评分。

1.4 血清淀粉酶的检测和胰腺病理学观察与评分:血清淀粉酶的测定,按全自动生化仪和淀粉酶试剂盒检测。对胰腺组织标本进行胰腺病理学观察与评分(表 1),每张切片随机选 10 个高倍镜视野($\times 400$),按表中胰腺组织损伤病理学评分标准评分,无表中各项病理改变计 0 分。

表 1 SAP 大鼠胰腺组织病理变化评分标准

Table 1 Standard of pathological change score in pancreas of rats with SAP

病理分级	病理改变	评分
水肿	小叶间区域性水肿,叶间裂增宽	1
	小叶间弥漫性水肿,小叶内间隙增宽	2
	小叶间水肿增大,腺泡肿胀分离	3
炎细胞浸润	白细胞 < 20 个/高倍镜视野	1
	白细胞 20~50 个/高倍镜视野	2
	白细胞 > 30 个/高倍镜视野或出现微脓肿	3
出血	实质出血 < 20%	1
	实质出血 20%~50%	2
	实质出血 > 50%	3
坏死	坏死面积 < 20%	1
	坏死面积 20%~50%	2
	坏死面积 > 50%	3

1.5 p38 MAPK 活性检测:提取胰腺组织总蛋白,制备等量蛋白质样品,用 SDS-PAGE 进行蛋白分离,电泳结束后电转移至 PVDF 膜,以含 5% 牛血清白蛋白的 TBST 溶液室温封闭 1 h,一抗兔来源的磷酸化 p38 MAPK 多抗 1:1 000 稀释 4 ℃ 孵育过夜,再与二抗(HRP 标记的羊抗兔 IgG)4 ℃ 孵育过夜。ECL 化学发光试剂检测阳性信号。为校正蛋白上样量的一致,曝光后的膜以膜解吸液(100 mmol/L β -ME, 2% SDS, 62.5 mmol/L tris-HCl, pH 6.7)于 50 ℃ 洗脱 30 min,然后封闭,再用抗 p38 总蛋白抗体检测作为内对照。照片用 Bio-Rad 图像处理系统采集 X 线片的条带,用 Quantity One 4.5 图像分析软件进行条带灰度扫描。以上实验均重复 3 次,取其平均值为最终数据。

1.6 统计学分析:所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较应用统计学软件 SPSS11.5 单因素方差分析。

2 结果

2.1 血清淀粉酶和病理学观察:血清淀粉酶结果显示,SAP 组和 BN 组在各时相点较 NC 组显著升高 ($P<0.05$),但 BN 组在 3、6、24 h 较 SAP 组显著降低 ($P<0.05$),见表 2。病理学结果显示,NC 组各时相点腹腔内未见明显异常,胰腺结构大致正常;SAP 组有血性腹水,胰腺有坏死灶,肠系膜、大网膜上有大量皂化斑,胰腺间质和腺小叶炎症细胞浸润,有弥漫性出血及片状坏死,随着时间后移,病变逐渐加重;BN 组在中后期较 SAP 组有所减轻。病理学评分结果显示,SAP 组和 BN 组在各时相点较 NC 组显著升高 ($P<0.05$),但 BN 组在 3、6、12 h 较

SAP 组显著降低 ($P<0.05$),见表 3。
2.2 p38 MAPK 的表达与激活情况及 BN52021 的影响:NC 组在各时相点胰腺组织只检测到少量磷酸化的 p38 MAPK (p-p38),见图 1-A。SAP 组和 BN 组在各时相点胰腺组织中 p38 MAPK 的激活均较 NC 组显著升高 ($P<0.05$)。SAP 组胰腺组织的 p38 MAPK 的激活在造模后即迅速增加,3 h 达高峰,6、12 h 仍维持较高水平,在 24 h p38 MAPK 磷酸化水平仍高于 NC 组,见图 1-B。BN 组 p38 MAPK 表达与激活的变化趋势在时相点上与 SAP 组一致,但在 6、12、24 h 较 SAP 组显著降低 ($P<0.05$),见图 1-C 和图 2。

表 2 BN52021 对 SAP 大鼠血清淀粉酶活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=30$)

Table 2 Effect of BN52021 on serous amylase activity of rats with SAP ($\bar{x}\pm s, n=30$)

组 别	血清淀粉酶活性/(U·L ⁻¹)					
	1 h	2 h	3 h	6 h	12 h	24 h
NC	1 835.6±613.2	1 491.5±507.0	1 530.4±247.0	1 400.2±447.5	2 153.2±236.3	1 337.0±143.7
SAP	2 560.5±121.5*	2 810.5±147.2*	4 799.3±107.0*	4 919.7±139.6*	3 486.3±181.8*	2 283.0±127.0*
BN	2 214.5±109.1*#	3 331.7±196.4*#	4 185.0±147.8*#	3 784.7±124.1*#	3 454.0±264.1*	1 360.4±161.4#

与 NC 组比较: * $P<0.05$; 与 SPA 组比较: # $P<0.05$
* $P<0.05$ vs NC group; # $P<0.05$ vs SAP group

表 3 各组 SAP 大鼠胰腺组织病理评分 ($\bar{x}\pm s, n=30$)

Table 3 Patho-score of pancreas in rats with SAP among every groups ($\bar{x}\pm s, n=30$)

组 别	病理评分					
	1 h	2 h	3 h	6 h	12 h	24 h
NC	0.12±0.05	0.11±0.06	0.12±0.05	0.13±0.04	0.12±0.06	0.13±0.05
SAP	4.82±0.35*	7.65±0.40*	8.85±0.39*	9.15±0.55*	10.10±0.65*	11.75±0.25*
BN	5.55±0.30*	6.65±0.42*	5.95±0.19*#	5.55±0.36*#	6.72±0.30*#	9.95±0.58

与 NC 组比较: * $P<0.05$; 与 SAP 组比较: # $P<0.05$
* $P<0.05$ vs NC group; # $P<0.05$ vs SAP group

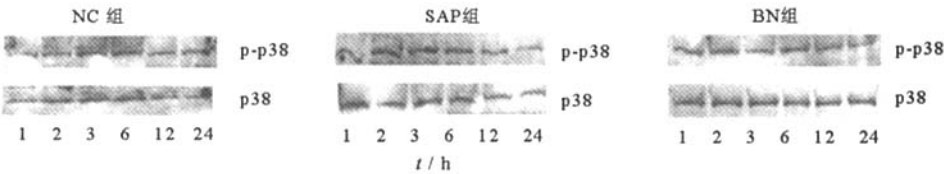


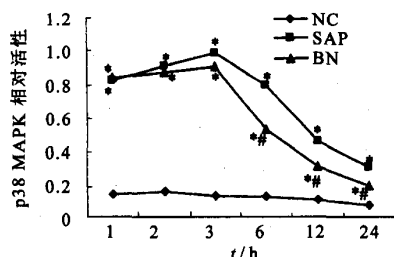
图 1 BN52021 对 SAP 大鼠胰腺组织中 p38 MAPK 激活的影响

Fig. 1 Effect of BN52021 on activation of p38 MAPK in pancreas of rats with SAP

3 讨论

SAP 是多种致病因素使胰酶异常激活导致胰腺自身消化,继而引起胰腺和全身性的炎症反应。应激状态下炎症细胞因子较多,如肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(IL)和 PAF 等,它们之间存在复杂的相互作用,形成连锁式反应。其中 PAF 是内源性的脂质介质。在适宜的刺激下,体内多种细胞能够合成和释放 PAF,特别是参与炎症反应的细胞,如单核/巨噬细胞、多形核白细胞、嗜酸性粒细

胞、嗜碱性粒细胞、血小板、肥大细胞、血管内皮细胞和淋巴细胞等^[4,5]。PAF 具有广泛的生物活性。体外实验表明,PAF 能够促进白细胞的趋化、聚集、分泌颗粒和产生氧自由基,促进白细胞与内皮细胞黏附;参与变态反应、创伤愈合、动脉粥样硬化、血管发生、细胞凋亡、生殖和长时程增强等病理生理过程^[4~6]。PAF 的生物活性是通过与其受体特异结合,激活多条细胞内信号转导途径而后产生的。PAF 受体属于 G 蛋白偶联受体(GPCR)家族。结合了 PAF 的



与 NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 SAP 组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs NC group; # $P < 0.05$ vs SAP group

图 2 BN52021 影响 SAP 大鼠胰腺组织中 p38 MAPK 激活的时效关系

Fig. 2 Time-effect relationship of BN52021 on activation of p38 MAPK in pancreas of rats with SAP

受体可激活磷脂酶 C (PLC), 通过激活百日咳毒素不敏感性 Gαq 蛋白、腺苷酸环化酶, 提高 cAMP 水平, 进而激活蛋白激酶 A (PKA), 还能够激活 MAPK 信号通路中的细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)、p38 MAPK 和 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 途径^[7]。其中 p38 MAPK 信号通路在炎症反应过程中发挥重要作用, 其主要功能是在转录后水平控制炎症介质基因表达。已有大量体内外实验证明, 胰腺炎时 p38 MAPK 活性明显升高, 同时伴随多种细胞因子基因表达的上调和血清水平的增高。在本实验中, 也检测到 SAP 大鼠胰腺组织中 p38 MAPK 的激活明显增强, SAP 组胰腺组织的 p38 MAPK 的激活在造模后即迅速增加, 3 h 达高峰, 6、12 h 仍维持较高水平, 在 24 h p38 MAPK 磷酸化水平仍高于对照组。

在本实验应用 BN52021 治疗 SAP 大鼠, 目的是探究阻止 PAF 信号向下游传递, 能否对 p38 MAPK 的激活起到抑制作用, 从而揭示 BN52021 治疗 SAP 的分子机制。银杏苦内酯是银杏树叶和根皮提取物中的双萜内酯, 是天然的特异性 PAF 拮抗剂, 其中以 BN52021 的作用为最强^[8]。BN52021 具颇多有益的药理作用, 如抗炎、抗过敏、抗氧化和神经保护作用等。以往研究发现, 用 BN52021 治疗能够阻止蛙皮素诱导的炎症反应, 减轻细胞破坏程度^[9]。此外, BN52021 除能够降低血清淀粉酶, 减轻胰腺水肿, 改善组织学评分, 降低 IL-6 水平外, 还能够减少细菌向远处的移位, 减少感染的发生机制^[10,11]。本实验结果显示, BN52021 可以减轻 SAP 大鼠胰腺组织损伤, 减轻腹水程度, 降低血清淀粉酶

水平, 与以往报道一致。本室的前期工作确定了 BN52021 治疗 SAP 的最佳有效剂量 (5 mg/kg)。本实验中观察 BN52021 对 p38 MAPK 表达与激活的影响, 其结果显示 BN 组 p38 MAPK 表达与激活的变化趋势在时相点上与 SAP 模型组一致, 但在 6、12、24 h 较 SAP 组显著降低, 且在各时相点较 NC 组显著升高, 表明 BN52021 可以部分抑制 SAP 大鼠胰腺组织 p38 MAPK 的活化, 以中后期为著。

总之, BN52021 通过阻止 PAF 信号的传导, 部分抑制 SAP 大鼠胰腺组织 p38 MAPK 活化。本研究为 BN52021 的临床应用提供了一定的理论基础。至于 BN52021 对 p38 MAPK 活化的抑制是通过 GPCR 途径, 还是通过干扰其他信号传导途径, 比如通过影响 GPCR 与蛋白酪氨酸激酶受体间交叉对话作用来实现的, 存在哪些中间信号分子, 还有待进一步研究来揭示。

References:

- [1] Kyriakis J M, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81: 807-869.
- [2] Saklatvala J. The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4: 372-377.
- [3] Aho H J, Koskensalo S M, Nevalainen T J, et al. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate induced acute haemorrhagic pancreatitis [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1980, 15: 411-416.
- [4] Stafforini D M, McIntyre T M, Zimmerman G A, et al. Platelet-activating factor, a pleiotrophic mediator of physiological and pathological processes [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2003, 40: 643-672.
- [5] Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice [J]. *Prog Lipid Res*, 2000, 39: 41-82.
- [6] Honda Z, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor [J]. *J Biochem*, 2002, 131: 773-779.
- [7] Liu L R, Xia S H. Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12: 539-545.
- [8] Van Beek T A. Ginkgolides and bilobalide: Their physical, chromatographic and spectroscopic properties [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13: 5001-5012.
- [9] Sandoval D, Gukovskaya A, Reavey P, et al. The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 1996, 111: 1081-1091.
- [10] de Souza L J, Sampietre S N, Assis R S, et al. Effect of platelet-activating factor antagonists (BN-52021, WEB-2170, and BB-882) on bacterial translocation in acute pancreatitis [J]. *J Gastrointest Surg*, 2001, 5: 364-370.
- [11] Bedirli A, Gokahmetoglu S, Sakrak O, et al. Beneficial effects of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase and BN52021 on bacterial translocation in cerulein-induced pancreatitis [J]. *Eur Surg Res*, 2004, 36: 136-141.