

p38 丝裂原活化蛋白激酶在实验性蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的作用

孙新刚, 马乾, 王改青, 王荔, 胡为民

山西医科大学第二医院神经内科, 山西省太原市 030001

摘 要:目的 探讨 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 在蛛网膜下腔出血 (SAH) 后早期脑损伤 (EBI) 中的作用。方法 成年雄性 SD 大鼠随机分配至对照组、SAH 组及 p38 MAPK 干预组, 每组 18 只。采用血管内穿刺法制作 SAH 模型, 干预组于术前 30 min 经侧脑室注射 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580, 造模后 24 h 处死。观察各组大鼠脑含水量和神经功能评分, RT-PCR 及免疫组化检测脑组织 p38 MAPK 表达。结果 与对照组相比, SAH 组大鼠脑含水量 ($t = -196.35$, $P < 0.01$) 及 p38 MAPK 的 mRNA 水平 ($t = -24.75$, $P < 0.01$) 均明显升高, 神经功能评分明显减低 ($t = 201.08$, $P < 0.01$)。与 SAH 组相比, 干预组脑含水量 ($t = 75.67$, $P < 0.01$) 及 p38 MAPK 的 mRNA 水平 ($t = 9.43$, $P < 0.01$) 均明显下降, 神经功能评分明显升高 ($t = -81.68$, $P < 0.01$)。免疫组化示 SAH 组及干预组均有 p38 MAPK 表达, 但干预组较 SAH 组表达水平明显下降 ($t = -3.37$, $P < 0.01$)。结论 p38 MAPK 在 EBI 形成机制中起重要作用, 有望成为防治 EBI 的药物作用新靶点。

关键词:蛛网膜下腔出血; 早期脑损伤; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 炎症反应

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.01.008

Role of p38 mitogen-activated protein kinase in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage

SUN Xin-Gang, MA Qian, WANG Gai-Qing, WANG Li, HU Wei-Min. Department of Neurology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: SUN Xin-Gang, E-mail: sunyanxia820701@163.com

Abstract: Objective To investigate the role of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in early brain injury (EBI) after experimental subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** A total of 54 adult male Sprague-Dawley (SD) rats were equally and randomly divided into SAH group, control group, and p38 MAPK intervention group. An SAH model was established using intravascular silk puncture. The intervention group was given an intracerebroventricular injection of SB203580 (a specific inhibitor of p38 MAPK) at 30 minutes before modeling. All SD rats were sacrificed at 24 hours after modeling. The brain water content and neurological function score were determined. The expression of p38 MAPK in the brain was measured by RT-PCR and immunohistochemistry. **Results** The SAH group had significantly higher brain water content and mRNA level of p38 MAPK and a significantly lower neurological function score compared with the control group ($t = -196.35$, $P < 0.01$; $t = -24.75$, $P < 0.01$; $t = 201.08$, $P < 0.01$). The p38 MAPK intervention group had significantly lower brain water content and mRNA level of p38 MAPK and a significantly higher neurological function score compared with the SAH group ($t = 75.67$, $P < 0.01$; $t = 9.43$, $P < 0.01$; $t = -81.68$, $P < 0.01$). The immunohistochemistry results showed that p38 MAPK protein was expressed only in the SAH group and the p38 MAPK intervention group, and the p38 MAPK group had significantly lower expression of p38 MAPK protein than the SAH group ($t = -3.37$, $P < 0.01$). **Conclusions** p38 MAPK plays an important role in the formation of EBI, and it may be a new drug target for the prevention and treatment of EBI.

Key words: subarachnoid hemorrhage; early brain injury; p38 mitogen-activated protein kinase; inflammatory response; rat

基金项目: 山西医科大学第二医院博士基金项目 (201501-7)

收稿日期: 2016-10-24; 修回日期: 2017-01-03

作者简介: 孙新刚 (1982-), 男, 副主任医师, 博士, 硕士生导师, 主要从事脑血管病的基础与临床研究。E-mail: sunyanxia820701@163.com。

早期脑损伤 early brain injury, EBI) 是导致蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 患者预后不佳的主要原因^[1], 炎症反应是其主要形成机制^[2]。p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 在多种炎症反应中起关键作用, 但其在 EBI 形成中的作用鲜有报道。本研究拟以 p38 MAPK 为切入点, 对 EBI 的形成机制进行探讨, 旨在为临床防治 EBI 提供新策略。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

成年雄性 SD 大鼠 54 只, 体重 250 ~ 300 g, 随机数字表法分为 SAH 组, 对照组及 p38 MAPK 干预组, 每组 18 只, 其中 6 只用于 RT-PCR 检测脑组织 p38 MAPK 的 mRNA, 6 只用于免疫组化检测脑组织 p38 MAPK 蛋白表达, 6 只用于检测脑含水量。若动物死亡则随机补充, 以保证每组样本量。

1.2 动物模型制作及标本处理

据文献方法, 采用血管内穿刺法制作 SAH 组动物模型^[3]。对照组大鼠采用相同手术过程, 但不突破血管壁。参考文献方法, 干预组于术前 30 min 经侧脑室注射 10 μ L 的 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580, 每只大鼠所用 SB203580 的浓度据其体重计算, 使每只大鼠所用剂量为 5 μ mol/kg^[4]。参照文献方法^[5,6], 动物建模后 24 h 处死, 断头取脑后取穿刺侧颞叶基底部脑组织为实验标本^[7]。拟用于免疫组化检测的大鼠, 取适当大小标本放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 备用。拟用于 RT-PCR 检测的大鼠, 取适当大小标本装入微量离心管内, 同上清液置入 -70℃ 冰箱内保存备用。拟用于脑含水量检测的大鼠切取适当大小标本后直接测量。

1.3 神经功能评分

所有动物处死前行神经功能评分。评分方法参照 Garcia 标准, 共包括 6 项: 四肢运动对称性, 攀爬运动, 前爪伸展性, 自主运动, 肢体本体感觉及触须反应, 得分越低神经功能缺失越严重。

1.4 脑含水量检测

评估大鼠脑含水量的方法如下: 断头取脑并切取适当大小血肿周围脑组织后直接称质量 (湿质量), 后在 105℃ 烤箱中烘烤 72 h, 随后再称质量 (干质量)。脑含水量 = (湿质量 - 干质量) / 湿质量 \times 100%。

1.5 p38 MAPK 表达检测

1.5.1 RT-PCR 检测 取出 -70℃ 冰箱中保存的

标本, 按说明书依次进行提取总 RNA, 合成第 1、2 链, 电泳分析等步骤。凝胶图像分析系统检测灰度, p38 MAPK/ β -actin 比值表示 p38 MAPK 的 mRNA 相对水平。

1.5.2 免疫组化检测 按参照文献方法制作石蜡切片^[8], 进行 SABC 染色并检测 p38 MAPK 表达; 按参考文献方法采用量化评分表评价 p38 MAPK 的表达程度^[9]。

1.6 统计学分析

数据以 SPSS 18.0 统计软件处理, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组动物神经功能评分及脑含水量比较

与对照组相比, SAH 组脑含水量 ($t = -196.35$, $P < 0.01$) 明显升高, 神经功能评分 ($t = 201.08$, $P < 0.01$) 明显下降。干预组与对照组相比, 脑含水量 ($t = -115.21$, $P < 0.01$) 也明显升高, 神经功能评分亦明显下降 ($t = 105.77$, $P < 0.01$), 但与 SAH 组相比其脑含水量明显下降 ($t = 75.67$, $P < 0.01$), 神经功能评分明显升高 ($t = -81.68$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能评分及脑含水量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	神经功能评分	脑含水量 (%)
对照组	6	17.29 \pm 1.00	74.02 \pm 0.45
干预组	6	13.20 \pm 0.87 ^{ab}	78.05 \pm 0.68 ^{ab}
SAH 组	6	10.02 \pm 0.97 ^a	81.19 \pm 0.73 ^a

注: a 为与对照组相比, $P < 0.01$; b 为与 SAH 组相比, $P < 0.01$ 。

2.2 RT-PCR 检测各组大鼠脑组织 p38 MAPK 的 mRNA 表达水平

SAH 组 p38 MAPK 的 mRNA 表达水平较对照组明显增高, 差异有统计学意义 ($t = -24.75$, $P < 0.01$)。干预组与对照组相比, p38 MAPK 的 mRNA 表达水平也明显升高 ($t = -6.85$, $P < 0.01$), 但与 SAH 组相比明显下降 ($t = 9.43$, $P < 0.01$)。见表 2。

2.3 免疫组化检测各组大鼠脑组织 p38 MAPK 蛋白表达

对照组未见明显染色, 而 SAH 组及干预组均可见较多棕黄色染色 (图 1)。与 SAH 组相比, 干预组 p38 MAPK 的表达评分明显下降, 差异有统计学意义 ($t = -3.37$, $P < 0.01$) (表 2)。

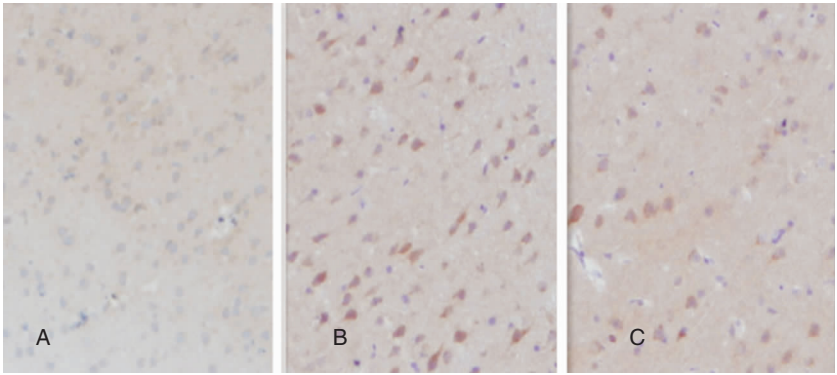


图 1 免疫组化检测各组大鼠脑组织 p38MAPK 蛋白表达 (SABC, ×200)。
注: A: 对照组; B: SAH 组; C: 干预组。

表 2 各组大鼠脑组织 p38MAPK 的表达比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	RT-PCR 检测 mRNA 表达	免疫组化检测 蛋白表达
对照组	6	0.400 ± 0.063	0.17 ± 0.41
干预组	6	3.299 ± 0.521 ^{ab}	1.17 ± 0.41 ^b
SAH 组	6	1.891 ± 0.386 ^a	1.83 ± 0.41

注: a 为与对照组相比, $P < 0.01$; b 为与 SAH 组相比, $P < 0.01$ 。

3 讨论

SAH 是一种神经系统危急重症, 具有高死亡率及高致残率的特点^[10]。传统观点认为, 患者起病 3 d 后出现的脑血管痉挛是导致其不良预后的主要原因, 但近年来研究发现, 导致患者预后不佳的主要原因是 EBI^[1]。本研究中 SAH 组及干预组动物有神经功能明显缺失, 脑含水量明显增加, 提示有 EBI 形成。

EBI 是指 SAH 后 72 h 内全脑组织所发生的直接损伤, 涉及血脑屏障破坏、脑水肿及脑细胞凋亡等一系列病理事件^[1], 其形成机制是多种因素共同参与的过程, 其中炎症级联反应起主导作用^[2]。SAH 后的出血组织可作为抗原物质刺激炎症细胞, 激活细胞内的信号途径, 促使炎性介质基因转录与表达^[11], 导致以白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6 (IL-6) 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 为主的炎性介质大量释放, 从而产生炎症级联反应并最终导致 EBI 形成^[12]。p38MAPK 在多种炎症反应中起关键作用, 但既往有关 p38MAPK 在 SAH 后炎症反应中作用的研究主要集中于脑血管痉挛^[13], 在 EBI 形成中的作用则鲜有报道。本研究中 SAH 组大鼠脑组织 p38MAPK 表达水平及脑含水量均较对照组明显增加, 干预组在抑制 p38MAPK 的表达后其脑含水量即较 SAH 组明显减轻, 表明 p38MAPK 在 EBI 的形

成机制中起重要作用, 而有关 p38MAPK 在 SAH 后不同时间点的表达时相及其参与调控 EBI 形成的具体机制则有待于进一步深入研究。

近年来, 免疫机制探讨已成为防治 EBI 的研究热点^[14]。p38MAPK 是介导多种炎症反应细胞内信号转导的最终通路^[15], 本研究结果表明, 抑制 p38MAPK 表达可明显减轻大鼠 SAH 后 EBI 程度。因此, p38MAPK 有望成为防治 EBI 形成的药物作用新靶点。

参 考 文 献

[1] Zhang XS, Zhang X, Wu Q, et al. Astaxanthin alleviates early brain injury following subarachnoid hemorrhage in rats: possible involvement of Akt/Bad signaling [J]. Mar Drugs, 2014, 12 (8): 4291-4310.

[2] Zhou C, Xie G, Wang C, et al. Decreased progranulin levels in patients and rats with subarachnoid hemorrhage: a potential role in inhibiting inflammation by suppressing neutrophil recruitment [J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 200.

[3] Bederson JB, Germano IM, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat [J]. Stroke, 1995, 26 (6): 1086-1091.

[4] Kocanova S, Buytaert E, Matroule JY, et al. Induction of heme-oxygenase 1 requires the p38MAPK and pathways and suppresses apoptotic cell death following hypericin-mediated photodynamic therapy [J]. Apoptosis, 2007, 12 (4): 731-741.

[5] 陈佳琳, 姚声涛, 郭宗铎. TNF- α 在实验性蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的作用 [J]. 第三军医大学学报, 2011, 33 (15): 1620-1622.

[6] Zhang XS, Wu Q, Wu LY, et al. Sirtuin 1 activation protects against early brain injury after experimental subarachnoid

- hemorrhage in rats [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(10): e2416.
- [7] Zhang XS, Zhang X, Zhou ML, et al. Amelioration of oxidative stress and protection against early brain injury by astaxanthin after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *J Neurosurg*, 2014, 121(1): 42-54.
- [8] 郭宗铎, 孙晓川, 何朝晖, 等. 蛛网膜下腔出血后早期海马 MMP-9 的表达与海马神经元凋亡的相关性研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(1): 71-74.
- [9] Tsurutani H, Ohkuma H, Suzuki S. Effects of thrombin inhibitor on thrombin-related signal transduction and cerebral vasospasm in the rabbit subarachnoid hemorrhage model [J]. *Stroke*, 2003, 34(6): 1497-1500.
- [10] 孙丰兵, 李世亭, 万亮. 高迁移率族蛋白 B1 与自发性蛛网膜下腔出血相关性的研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2015, 42(1): 59-62.
- [11] Huang L, Wan J, Chen Y, et al. Inhibitory effects of p38 inhibitor against mitochondrial dysfunction in the early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice [J]. *Brain Res*, 2013, 1517: 133-140.
- [12] Zhong YW, Wu J, Hu HL, et al. Protective effect 3, 4-dihydroxyphenylethanol in subarachnoid hemorrhage provoked oxidative neuropathy [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(3): 1908-1914.
- [13] Zhang X, Zhao XD, Shi JX, et al. Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway attenuates cerebral vasospasm following experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2011, 41(3): 244-250.
- [14] 王超, 杨智勇, 路华, 等. Toll 样受体 4 信号通路在蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的机制研究 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2012, 39(1): 25-28.
- [15] Zhang DD, Yan HY, Li H, et al. TGF β -activated Kinase 1 (TAK1) Inhibition by 5Z-7-Oxozeaenol Attenuates Early Brain Injury after Experimental Subarachnoid Hemorrhage [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(32): 19900-19909.