文章编号:1000-5404(2006)16-1667-04

论著

# 阻断 p38 途径对地塞米松诱导的胸腺细胞凋亡的影响

王 通,曾耀英,何贤辉,邢飞跃,梁佩燕,贺 芳 (暨南大学组织移植与免疫教育部重点实验室,广州 510630)

**提 要:目的** 研究阻断 p38 途径对地塞米松(dexamethasone, DEX)诱导的胸腺细胞凋亡的影响。**方法** Western Blott 检测 DEX 对 p38 途径的阻断作用。以 SB203580(SB)阻断 BALB/c 小鼠胸腺细胞 p38 途径,在 3、5 和 7 h,利用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡;利用 $DiOC_6(3)$/PI 双染流式细胞术检测线粒体膜电势($\triangle\psi_m$)和细胞膜完整性变化。**结果** DEX 显著减少了胸腺细胞 p38 蛋白含量;阻断 p38 后 DEX 诱导小鼠胸腺细胞晚期凋亡率显著增加($P<0.01$);DEX 诱导了胸腺细胞$\triangle\psi_m$降低,同时阻断 p38 途径后,$DiOC_6(3)$阴性 PI 阳性细胞显著增多($P<0.01$)。**结论** 阻断 p38 后加速了 DEX 介导的小鼠胸腺细胞凋亡中细胞膜完整性的破坏,该现象可能与线粒体功能有关。

**关键词**:p38;胸腺细胞;细胞膜完整性;线粒体
**中图法分类号**:R322.53;R329.25;R977.11 **文献标识码**:A

# Effect of p38 inhibition on dexamethasone induced thymocyte apoptosis

WANG Tong, ZENG Yao-ying, HE Xian-hui, XING Fei-yue, LIANG Pei-yan, HE Fang (Key Laboratory of Education Ministry for Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract**: Objective To study the effect of p38 inhibition on dexamethasone (DEX) induced thymocyte apoptosis. Methods The thymocytes were isolated from male Balb/c mice. p38 inhibition caused by DEX was detected with Western blotting. p38 pathway was blocked by SB203580 (SB), then the apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry, the mitochondrial inner membrane potential ($\triangle\psi_m$) and cell membrane integrity change were examined with $DiOC_6(3)$/PI double staining flow cytometry. Results DEX significantly reduced total p38 content in mouse thymocytes. The late phase rate of apoptosis induced by DEX was significantly increased by simultaneous p38 blocking. DEX induced thymocyte $\triangle\psi_m$ decrease and the $DiOC_6(3)^-PI^+$ cells were significantly increased by simultaneous p38 blocking. Conclusion Cell membrane integrity loss in DEX induced mouse thymocyte apoptosis could be accelerated by p38 inhibition, and mitochondrial function change may have relationship with it.

**Key words**: p38; thymocyte; cell membrane integrity; mitochondrion

细胞要随时面对外源和内源的各种信号,在进化压力作用下,细胞学会了整合这些信号通路来抉择是生存还是程序性死亡(凋亡)[1]。细胞凋亡信号通路的最终结点通常是凋亡执行者 caspase-3,它的激活可通过线粒体途径、也可通过 Fas/FasL 途径实现[2]。就线粒体途径来说,丝裂原相关蛋白激酶(mitogen associated protein kinase, MAPK)是关键信号。MAPK 主要包括 ERK、JNK、p38,它们的共同特点是作用的两面性,可以在一定条件下参与增殖分化,也可介导细胞凋亡[3]。

多有报道指出在氧化压力、放射线作用和炎性因子等刺激因素下,p38 参与线粒体细胞凋亡途径的调控[1];然而,也有报道表明 p38 可以促进细胞生存[4]

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30230350);广东省自然科学基金资助项目(5300413);暨南大学引进优秀人才科研启动基金资助项目(51204066)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30230350), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (5300413) and the Stating Funds for Excellent Personnel by Jinan University (51204066)

作者简介:王 通(1975-),男,吉林省长春市人,博士,助理研究员,主要从事分子细胞生物学方面的研究。电话:(020)85225180, E-mail: tongwang@jnu.edu.cn
通讯作者:曾耀英,E-mail: zengyaoying@gmail.com

收稿日期:2005-08-31;修回日期:2005-10-21

生长[5]和分化[6]。目前已知糖皮质激素可以通过线粒体途径诱导小鼠胸腺细胞凋亡，可 p38 在该过程中的作用少见报道[7]。本研究以凋亡和线粒体为研究对象，探讨 p38 途径在胸腺细胞凋亡中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂

雄性 SPF 级 12～15 g BALB/c 小鼠，3 周龄，购自第一军医大学实验动物中心。DEX、SB203580（p38 途径特异性阻断剂，简称 SB）、p38 单克隆抗体、碘化丙啶（PI）、L-谷氨酰胺、β-二巯基乙醇、Hepes 为 Sigma 产品；RPMI1640 培养基和胎牛血清（FBS）为 Gibco 公司产品；Annexin -FITC 购自 Becton Dickinson 公司（BD 公司）；3，3′-dihexyloxacarbocyanine iodide［简称 $DiOC_6(3)$］、二甲基亚砜（DMSO）购自美国 Molecular Probes 公司；FACSCalibur 流式细胞仪为 BD 公司产品。

### 1.2 胸腺细胞的获取

将 BALB/c 小鼠断髓处死，无菌分离胸腺，于 200 目尼龙网过滤。离心（125 × g，5 min）收集细胞，用 4 ℃磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.2）重悬细胞，离心洗涤（125 × g，5 min）细胞 2 次，细胞重悬于含 100 ml/L FBS 的 RPMI1640 完全培养基中，计数并且调整细胞浓度至 $1 \times 10^9$ 个/L，置于 24 孔细胞培养板并使每孔终体积为 1 ml，在 37 ℃、5% $CO_2$ 恒温饱和湿度细胞培养箱内培养。

### 1.3 实验分组

胸腺细胞随机分为 4 组，每组 5 个重复。空白对照组（control 组），胸腺细胞仅在完全培养基内培养；单纯 SB 对照组（SB Only 组），胸腺细胞以单纯 SB 预孵育 45 min，之后继续培养；DEX 诱导组（DEX 组）；DEX + SB 组（DEX + SB 组），细胞以 SB 预孵育 45 min，之后加入 DEX 开始计时并继续培养。实验中如果用到，SB 终浓度为 10 μmol/L，DEX 终浓度 1 μmol/L。

另外，在凋亡实验中设溶剂对照组（简称 DMSO 组），即细胞在含终浓度 1 μl/ml DMSO（等于 SB 组和 SB + DEX 组的溶剂浓度）的完全培养基中培养。

### 1.4 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析

分别在 0、30 min、1、3 h 时点收集对照组和 DEX 组细胞，每个样品约需细胞 $1 \times 10^6$ 个，RIPA 法裂解后用 Lowry 法进行蛋白含量测定，调整各样品使其分别含有等量总蛋白。10% SDS-PAGE 电泳后，在转移槽中将蛋白从凝胶转移至 PVDF 膜上（14 V，过夜），用丽春红染液预染并标记蛋白分子质量。TTBS 缓冲液洗膜、封闭、4 ℃过夜。分别加入 TTBS 缓冲液稀释的 p38 单克隆抗体（1∶500）为一抗，37 ℃孵育 1.5 h，TTBS 洗膜后加入二抗，37 ℃孵育 1.5 h，TTBS 缓冲液洗膜后，将膜浸入显色液中。室温闭光显色 15 min，用蒸馏水终止反应。

### 1.5 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡

各组于 3、5、7 h 时点收集细胞约 $5 \times 10^5$ 个，用 1 ml 4 ℃ PBS 离心（125 × g，5 min）洗涤细胞 2 次，每个样品细胞重悬于 80 μl 染料结合缓冲液［结合缓冲液：10 mmol/L Hepes（NaOH pH 7.4），140 mmol/L NaCl，2.5 mmol/L $CaCl_2$］中，然后分别加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 染液（以 PBS 配制，PI 终浓度 50 mg/L），振荡器上轻微振荡混匀后常温下静置 15 min；最后加入 250 μl 结合缓冲液，用 FACSCalibur 流式细胞仪检测。参考配置，FL2-FL1 12.5%。

### 1.6 DiOC6(3)/PI 双染流式细胞术检测线粒体膜电势

用 DMSO 将 $DiOC_6(3)$ 稀释成 40 μmol/L 的储存液，-20 ℃保存。临用前用 PBS 稀释成 400 nmol/L 的工作液。各组于 11 h 取约 $5 \times 10^5$ 个，以终体积 380 μl PBS 重悬细胞、终浓度 20 nmol/L $DiOC_6(3)$，37 ℃水浴轻柔振荡 15 min；之后加入 5 μl PI 染液（以 PBS 配制仅含 50 μg/ml PI），流式细胞术检测。参考配置，FL2-FL1 7.5%。

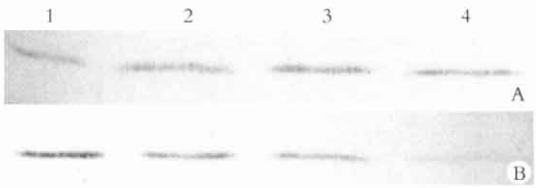
### 1.7 统计学处理

流式细胞术获得的数据用 CELLQuest 和 WinMDI 2.8 Version 软件分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间差异用非配对 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 DEX 和 SB 对胸腺细胞 p38 总量的影响

Western blot 结果显示对照组 p38 含量随时间变化不显著，而 DEX 组 p38 含量在 0 min 最强，随培养时间延长呈显著减弱趋势，并且在 180 min 明显被阻断；在 30、60 和 180 min 时间点，DEX 组 p38 含量均显著低于对照组（图 1）。




A：对照组；B：地塞米松组。1：0 min；2：30 min；3：60min；4：180 min

**图 1 地塞米松对 p38 的阻断作用的 Western Blot 结果**

### 2.2 阻断 p38 对胸腺细胞凋亡的影响

本研究 Annexin V-FITC/PI 双染后，流式细胞术检测结果呈现 3 个细胞群：①双阴性（正常细胞）；②Annexin V 阳性、PI 阴性（早期凋亡细胞）；③双阳性（晚期凋亡细胞）（图 2）。

Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术结果显示，DMSO 组的早期凋亡率和晚期凋亡率分别与对照组无显著差异（$P < 0.05$）（图 2）。

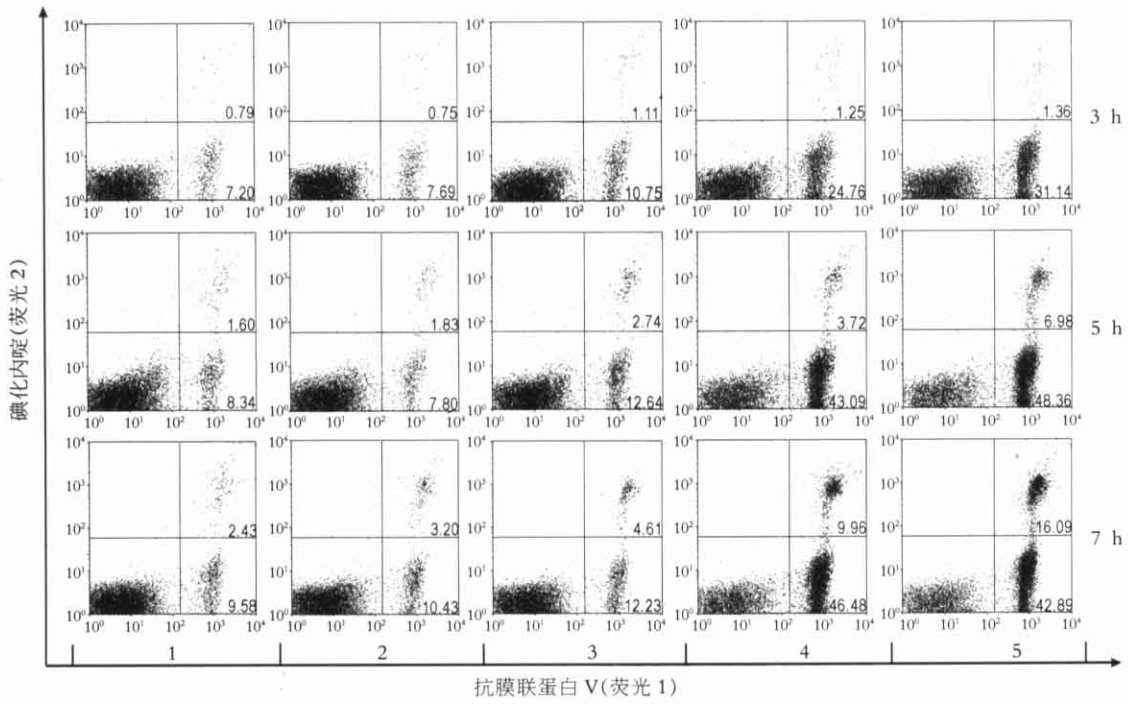
胸腺细胞在 3、5 和 7 h 早期凋亡率分别为（22.63 ± 2.55）%、（42.92 ± 1.67）% 和（46.34 ± 2.22）%，显著高于对照组，分别为（6.97 ± 0.39）%、（8.18 ± 1.35）% 和（9.46 ± 0.77）%（$P < 0.01$）；相同时点下，SB only 组细胞凋亡率分别为（10.23 ± 1.11）%、（13.72 ± 0.86）% 和（12.25 ± 1.28）%，其

中，3 h 和 5 h 与对照组有统计学差异，($P<0.01$)；DEX + SB 组在 3 h 和 5 h 时点细胞早期凋亡率显著高于 DEX 组($P<0.01$)，7 h 时点显著低于 DEX 组，($P<0.01$)(图 2)。

DEX 组各时点晚期凋亡率显著高于对照组($P<0.01$)；SB only 组晚期凋亡率在 7 h 与对照组有统计学差异($P<0.01$)，其余时点差异不显著($P<0.05$)。；DEX + SB 组在 3、5 和 7 h 时点细胞晚期凋亡率分别为(1.49 ± 0.61)% 、(7.34 ± 1.52)% 和(16.88 ± 1.38)%，其中，5 h 和 7 h 显著高于 DEX 组，($P<0.01$)(图 2)。

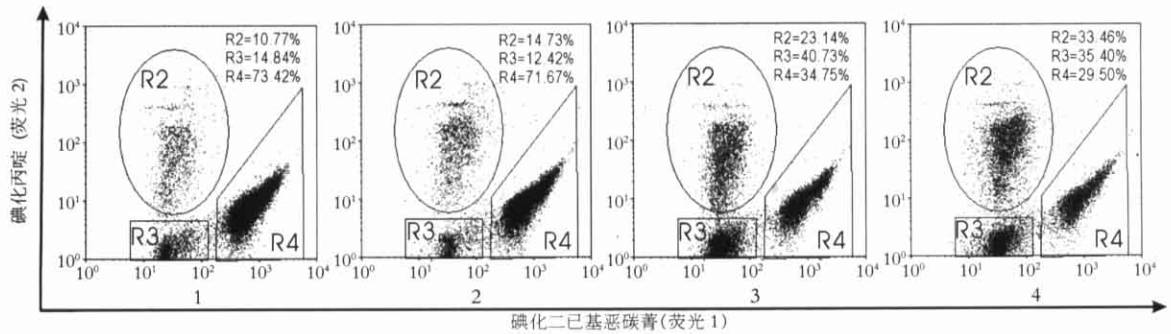
### 2.3　阻断 p38 对胸腺细胞线粒体膜电势的影响

本研究 $DiOC_6(3)$/PI 检测结果呈现 3 个细胞群：①正常细胞，$DiOC_6(3)$ 阳性，PI 阴性；②$\triangle\psi_m$ 降低的早期凋亡细胞，$DiOC_6(3)$ 和 PI 双阴性；③$\triangle\psi_m$ 降低的晚期凋亡细胞，$DiOC_6(3)$ 阴性，PI 阳性(图 3)。




1：对照组；2：DMSO 组；3：单独 SB 组；4：地塞米松组；5：地塞米松 + SB 组

**图 2　不同时点代表性 Annexin V-FITC/PI 双染检测结果($n=5$)**




1：对照组；2：单独 SB 组；3：地塞米松组；4：地塞米松 + SB 组

**图 3　$DiOC_6(3)$/PI 检测胸腺细胞凋亡的线粒体膜电势和细胞膜完整性变化($n=5$)**

$DiOC_6(3)$/PI 双染结果显示，DEX 组 $\triangle\psi_m$ 降低而细胞膜完整的细胞率为(41.22 ± 1.27)%，显著高于对照组(14.19 ± 2.00)%，($P<0.01$)；SB only 组该群细胞率为(11.59 ± 1.70)%，与对照组无显著差异($P<0.05$)；DEX + SB 组该群细胞率为(34.45 ± 2.14)%，显著低于 DEX 组，($P<0.01$)(图 3)。

DEX 组 $\triangle\psi_m$ 降低并且细胞膜完整性破坏的细胞比率为(22.09 ± 1.31)%，显著高于对照组(9.36 ± 1.17)%，($P<0.01$)；SB only 组该群细胞率为(14.89 ± 1.70)%，显著低于对照组($P<0.01$)；DEX + SB 组该群细胞率为(34.25 ± 1.64)%，显著高于 DEX 组，($P<0.01$)(图 3)。

## 3 讨论

我们以往的研究表明，DEX 可阻断小鼠胸腺细胞 ERK 途径，同时，该途径阻断与细胞凋亡密切相关（数据另文发表）；同时，我们也检测到该过程对 JNK 途径的阻断作用（数据另文发表）。由于 p38 在大量的研究模型中被确认为凋亡的促进者，我们曾推测 DEX 经 p38 途径促进胸腺细胞凋亡。然而，本研究结果与该假设相反，DEX 同样阻断了 p38 途径（图1）。这表明，DEX 阻断了所有与细胞增殖相关的 MAPK；那么，DEX 促进胸腺细胞凋亡的机制至少不是传统的 MAPK 信号级联反应，而更倾向于通过细胞周期阻断实现。

本研究结果显示，阻断 p38 后，胸腺细胞凋亡增加，并且显示出与 DEX 有协同作用（图2）。p38 上游有两种激酶，即 MKK3 和 MKK6，目前已知 MKK6/p38 途径参与负选择，而 MKK3/p38 途径与分化密切相关[8]。Salmon 等[9]曾指出在抗原受体介导的细胞凋亡中，利用 SB203580 阻断 p38 不能抑制凋亡。Park 等[4]的研究表明炭疽杆菌诱导的巨嗜细胞凋亡是通过阻断 p38 实现的。这些研究表明，根据细胞类型和条件不同，p38 可以参与细胞的生存或死亡，这与本研究的结果有一定可比性。近年来利用转基因动物研究发现，胚胎死亡与 p38 未能正常激活有密切关系[10]；也有报道指出体内激活 p38 并不能增加胸腺细胞凋亡[11]。这表明，p38 在胸腺细胞中的作用可能具有一定的特殊性，进一步研究 p38 在中枢耐受过程中的作用有重要的科学意义。

研究表明，DEX 可以诱导小鼠胸腺细胞线粒体去极化作用[12]，这与本研究 $DiOC_6(3)$/PI 检测结果一致（图3）。同时本研究表明，阻断 p38 有显著的介导细胞膜完整性破坏的现象（图3）。正常细胞膜存在内负外正的电位差，其机制是静息状态下 $K^+$ 的通透性大于 $Na^+$，从而造成极化状态而形成。因此，细胞膜 $Na^+/K^+$ 离子泵对于维持细胞膜电位有重要作用。由于 $Na^+/K^+$ 离子泵是以主动运输形式存在的离子通道，需要耗费 ATP 完成蛋白构象变化，以维持细胞膜电位，缺乏能量的细胞膜电位呈去极化状态[13]。这样，细胞膜表面的极性分子（例如磷脂酰丝氨酸，简称 PS）会因为电位改变而外翻，从而启动细胞凋亡。因此，细胞膜的完整性一定程度上依赖于线粒体的能量供给。早期凋亡具正常功能的线粒体较多，细胞膜完整性未遭到破坏；而晚期凋亡中大量线粒体去极化而丧失提供 ATP 的能力，细胞膜完整性丧失。从本研究结果来看，p38 促进细胞膜完整性降低的主要机制可能与线粒体功能改变有关。

## 参考文献：


[1] WADA T, PENNINGER J M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation[J]. Oncogene, 2004, 23(16): 2838 - 2849.

[2] THORBURN D R. Diverse powerhouses[J]. Nat Genet, 2004, 36(1): 13 - 14.

[3] RUBINFELD H, SEGER R. The ERK cascade as a prototype of MAPK signaling pathways[J]. Methods Mol Biol, 2004, 250: 1 - 28.

[4] PARK J M, GRETEN F R, LI Z W, *et al*. Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition[J]. Science, 2002, 297(5589): 2048 - 2051.

[5] JURETIC N, SANTIBANEZ J F, HURTADO C, *et al*. ERK 1, 2 and p38 pathways are involved in the proliferative stimuli mediated by urokinase in osteoblastic SaOS-2 cell line[J]. J Cell Biochem, 2001, 83(1): 92 - 98.

[6] YOSIMICHI G, NAKANISHI T, NISHIDA T, *et al*. CTGF/HCS24 induces chondrocyte differentiation through a p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), and proliferation through a p44/42 MAPK/extracellular-signal regulated kinase (ERK)[J]. Eur J Biochem, 2001, 268(23): 6058 - 6065.

[7] 梁佩燕，曾耀英，王 通，等. 地塞米松影响小鼠胸腺细胞线粒体膜电势变化研究[J]. 中国病理生理杂志，2005，21(5)：962 - 965.

[8] TANAKA N, KAMANAKA M, ENSLEN H, *et al*. Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis[J]. EMBO Rep, 2002, 3(8): 785 - 791.

[9] SALMON R A, FOLTZ I N, YOUNG P R, *et al*. The p38 mitogen-activated protein kinase is activated by ligation of the T or B lymphocyte antigen receptors, Fas or CD40, but suppression of kinase activity does not inhibit apoptosis induced by antigen receptors[J]. J Immunol, 1997, 159(11): 5309 - 5317.

[10] ADAMS R H, PORRAS A, ALONSO G, *et al*. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development[J]. Mol Cell, 2000, 6(1): 109 - 116.

[11] DIEHL N L, ENSLEN H, FORTNER K A, *et al*. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway arrests cell cycle progression and differentiation of immature thymocytes *in vivo*[J]. J Exp Med, 2000, 191(2): 321 - 334.

[12] 王 通，曾耀英，肇静娴，等. 地塞米松介导胸腺细胞凋亡过程中线粒体和细胞结构蛋白的变化[J]. 中国病理生理杂志，2005，21(7)：1415 - 1418.

[13] CLAUSEN T, GISSEL H. Role of Na,K pumps in restoring contractility following loss of cell membrane integrity in rat skeletal muscle[J]. Acta Physiol Scand, 2005, 183(3): 263 - 271.


（编辑 陈聪连）