文章编号:1000-5404(2006)21-2163-04

论著

P物质刺激下脊髓星形胶质细胞活化中磷酸化P38丝裂素活化蛋白激酶和c-fos的表达及作用

张 恒[1],周占松[1],刘丽梅[2],杨 忠[3],宋 波[1] (第三军医大学:[1]西南医院全军泌尿外科中心,[2]病理学研究所,[3]基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察P物质(substance P, SP)作用下,脊髓星形胶质细胞中P38丝裂素活化蛋白激酶的磷酸化(P-P38MAPK)和c-fos的表达,及P38MAPK磷酸化对炎性因子分泌的影响。**方法** 采用体外培养脊髓星形胶质细胞,施加SP刺激,分别采用Western blot和RT-PCR检测P38MAPK磷酸化和c-fos表达的变化,ELISA法检测SB203580阻断P38MAPK磷酸化对炎性因子TNF-α、IL-1β、NO分泌的影响。**结果** 在SP(10^{-7}mol/L)刺激下,P38MAKP在15、30、45、60 min时均明显磷酸化,与对照组相比有显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$),磷酸化高峰在45 min;SP(10^{-7}mol/L)作用下c-fos表达明显,30 min、1、3、6 h均显著高于对照组($P<0.05$, $P<0.01$),3 h达到高峰;SP(10^{-7}mol/L)刺激脊髓星形胶质细胞明显分泌炎性因子IL-1β、TNF-α和NO($P<0.01$),SB203580阻断P38MAKP信号通路后TNF-α和NO的分泌下降($P<0.01$),IL-1β的分泌在阻断前后无显著性差异($P>0.05$)。**结论** SP作用下脊髓星形胶质细胞中P38MAPK和c-fos信号通路激活,P38MAPK磷酸化参与了SP作用下脊髓星形胶质细胞的活化及炎性因子的分泌,与星形胶质细胞在脊髓中枢对痛觉的调控有关。

关键词:星形胶质细胞;慢性疼痛;SP;IL-1β;NO;TNF-α;P38MAPK;c-fos
中图法分类号:R329.26; R338.1; R392.11 **文献标识码**:A

Expression of phosphorylated P38MAPK and c-fos in spinal cord astrocytes stimulated by SP

ZHANG Heng[1], ZHOU Zhan-song[1], LIU Li-mei[2], YANG Zhong[3], SONG Bo[1] ([1]Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, [2]Department of Pathology, [3]Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the expression of phosphorylated P38MAPK and c-fos in spinal cord astrocytes stimulated by SP. Methods The astrocytes of spinal cord were cultured *in vitro* and stimulated by SP, then the phosphorylation of P38MAPK and c-fos expression were investigated by Western blotting and RT-PCR, and TNF-α, IL-1β and NO excreted by astrocytes treated with SB203580 by ELISA. Results Enhanced P38MAPK phosphorylation was found at 15, 30, 45, 60 min, significantly different with control ($P<0.05$, $P<0.01$), and the peak value appeared at 45 min. The c-fos expression in astrocytes stimulated by SP at 30 min, 1, 3, 6 h was higher than control ($P<0.05$, $P<0.01$), with the highest level at 3 h. The treatment of 10^{-7}mol/L SP for 12 h caused an increased excretion of IL-1β, TNF-α and NO. SB203580 could obviously inhibit the excretion of NO and TNF-α($P<0.01$) and had no obvious effect on IL-1β ($P>0.05$). Conclusion P38MAPK and c-fos in astrocytes could be activated by SP. P38MAPK took effect in the excretion of proinflammatory cytokines such as TNF-α and NO, and was correlated with pain regulation by astrocyte in spinal cord.

Key words: astrocyte; chronic pain; SP; IL-1β; NO; TNF-α; P38MAPK; c-fos

星形胶质细胞是中枢神经系统中数量最多,功能极其重要的细胞,与中枢神经系统功能、结构的维持,内环境的稳定、营养和再生修复有密切关系。近年来证实,激活的星形胶质细胞分泌炎性致痛因子如前列腺素,自由基,NO,IL-1β,TNF-α,IL-6等,均参与周围疼痛信号在脊髓中枢传导和调控的过程[1,2],其诱发因素很可能是神经传入纤维分泌的P物质(substance P, SP)、降钙素基因相关肽(calcitonin-gene related

作者简介:张 恒(1976-),男,贵州省瓮安县人,博士研究生,医师,主要从事慢性前列腺炎方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68753416,E-mail: Montest44@hotmail.com
通讯作者:宋 波,电话:(023)68754186
收稿日期:2006-01-11;修回日期:2006-05-10

peptide, CGRP)、ATP 及谷氨酸等,并和钙信号、P38MAPK 等信号途径激活有关[3],但 SP 作用下是否存在星形胶质细胞的激活及通过何种信号转导途径,尚少见明确报道,本实验通过 SP 作用于体外培养和纯化脊髓星形胶质细胞,观察 P38MAPK 的磷酸化和 c-fos的表达,并检测 SB203580 阻断 P38MAPK 前后炎性因子 IL-1β,TNF-α,NO 分泌的变化,以了解脊髓星形胶质细胞在 SP 作用下细胞激活的相关信号转导途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DME/F-12 培养基和小牛血清购自 Hyclone 公司,抗 P-P38MAPK抗体购自武汉博士德公司,二抗购自 Santa Cruzs 公司,化学发光剂购自 Singaling 公司,RNA 提取试剂 Tripure™ Isolation Regent 购自德国宝灵曼公司,引物合成和 RT-PCR 试剂盒购自上海生工生物工程公司,ELISA 试剂盒购自 Diaclone 公司,NO 试剂盒购自邦定泰克,其他试剂均为分析纯,所用溶液均以超纯水配置。

1.2 大鼠脊髓星形胶质细胞的培养

取 2~3 d 的 SPF 大鼠乳鼠 4 只(第三军医大学实验动物中心提供),消毒固定后,剖开椎管取出脊髓组织,清洗、剥离脊膜后扯碎,0.125% 的胰蛋白酶反复消化,离心收集细胞,在含有 10% 小牛血清的 DMEM/F-12 培养基中于 37 ℃、5% CO_2 中培养,3 d 换液 1 次,取 7 ~ 9 d 的细胞,换液后置 37 ℃恒温摇床振摇过夜(200 r/ min,约 12 h),去上清(主要含少突胶质细胞和小胶质细胞),轻洗 1 遍,所得细胞即是贴壁较牢的星形胶质细胞,经胰酶消化重悬后,按实验所需细胞密度接种至培养瓶或 6 孔板。取生长第 3 代的细胞用于实验。

1.3 Western blot 检测 P38MAPK 的磷酸化

第 3 代的星形胶质细胞按 1×10^6/ml 1ml 完全随机平行接种至 6 孔板,分别设立 0、15、30、45、60 min 时相组,实验组 SP 浓度为 10^{-7}mol/L,对照组加仅含 ITS 的无血清培养液。到达实验时间后,用冷的 Tris 缓冲盐溶液洗涤细胞,冰上每孔加入 500 μl 的细胞裂解液 1×RIPA buffer (50 mmol/L Tris - HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 10 ml/L Triton X-100, 1 g/L SDS, 10 g/L 脱氧胆酸, 5 mmol/L EDTA, 使用前加入 5 g/L Aprotinin, 2.0 mmol/L PMSF),冰上孵育 10min,刮取细胞并转移至 1.5 ml 的离心管,超声粉碎(500 W、5 s×5 次),10 000 r/min 离心 5 min,取上清冻存,Folin-酚法进行蛋白定量,SDS-PAGE 电泳,转膜,依次加入一抗(1∶1 000),二抗(1∶2 000)杂交,封闭,化学发光显色,用 Quantity One 4.4 软件分析图像,用积分光密度值相对比较蛋白的表达。

1.4 RT-PCR 检测 c-fos mRNA 的表达

第 3 代的星形胶质细胞按 1×10^6/ml 1 ml 完全随机平行接种至 6 孔板,按如下分组进行实验:分为 0、30 min、1、3、6 h 5 个时相,实验组 SP 浓度为 10^{-7}mol/L,对照组为含 ITS 的无血清培养液。

Tripure 提取 RNA,然后进行 cDNA 逆转录,PCR 扩增,产物用 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳,用 Quantity One 4.4 软件对电泳图像进行分析,用目的片段的积分光密度(IOD)与外参照比值来反映 mRNA 表达量的相对高低。

引物序列及循环条件为:

c-fos:正义链 5′-AGTCACCGTGCTCCTACCCAG-3′,反义链 5′-ATCTGTCTCCGCTTGGAGcGTAT-3′ (558 bp),循环条件:95 ℃ 60 s→65 ℃ 60 s→72 ℃ 60 s,40 循环。

β-actin:正义链 5′-ATGAGGATCCTCACCGAGCGAGCGCGGCTACAGc-3′, 反义链 5′-ACACCACTGTGTTGGCGTACAGGTCTTTGc-3′(321 bp),循环条件:94 ℃ 30 s→60 ℃ 20 s→72 ℃ 30 s,30 循环。

1.5 SB203580 阻断 P38MAPK 对炎性因子 IL-1β、TNF-α 和 NO 分泌的影响

1.5.1 实验分组 第 3 代的星形胶质细胞按 1×10^6/ml 1 ml平行接种至 6 孔板,实验分组:①正常对照组;②SP 刺激组;③SP 刺激 + SB203580 阻断组;④正常 + SB203580 阻断组。取培养上清液观察炎性因子 TNF-α、IL-1β 和 NO 分泌,实验组加 10^{-7}mol/L SP,正常对照组加仅含 ITS 的无血清培养液,SB203580 浓度为 10 μmol/L,预先加入孵育 10 min,各组实验时间均为 12 h。

1.5.2 ELISA 法检测 IL-1β,TNF-α 的分泌 按试剂盒的说明进行,基本操作步骤如下:彻底混匀将要使用的试剂,设立好空白和阳性对照,在样品孔中依次加入 100 μl 标准品和样品,每孔加入 50 μl 稀释好的生物素标记的检测因子的抗体,封闭,向每孔加入 100 μl 稀释好的链霉亲和素标记的 HRP,再封闭,孵育,洗板,加入底物溶液,在不透光的铝盒中孵育,每孔加入 100 μl 硫酸,终止反应,在酶标仪上以 450 nm 为主波长,以 620 nm 为参照波长,绘制标准曲线并读取每孔待测因子的浓度,含量用 ng/ml 来表示。

1.5.3 NO 的测定 按试剂盒说明测定,NO 含量的计算为:NO(μmol/L) = (样品管 OD/标准管 OD) ×100。

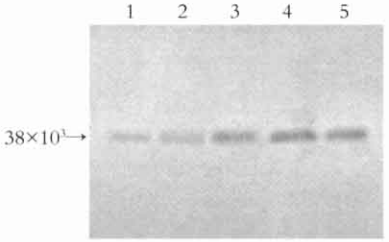
1.6 统计学处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计分析软件行方差分析。

2 结果

2.1 SP 刺激对脊髓星形胶质细胞 P38MAKP 磷酸化的影响

Western blot X 线片的扫描图像经 Quantity-one 4.4 软件分析,测出每带的积分光密度值,表示相对的蛋白含量,结果显示 SP 刺激使 P38MAKP 明显磷酸化活化,其光密度值在 15、30、45、60 min 均明显强于对照组($P<0.05$, $P<0.01$),所选时相的表达高峰在 45 min(图 1)。

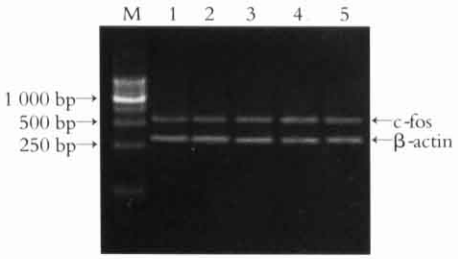


1:对照;2:15 min;3:30 min;4:45 min;5:60 min

图 1 P-P38MAPK Western blot 结果

2.2　SP 作用下脊髓星形胶质细胞 c-fos mRNA 的表达

凝胶扫描图像用 Quantity-one 4.4 软件进行分析，用扩增条带的光密度值与相应外参照 β-actin 的比值表示目的片段的相对表达量。RT-PCR 结果显示，所得产物和外参照在558 bp和321 bp 处可见 2 条扩增带，分别为 c-fos 和 β-actin。SP(10^{-7} mol/L)作用使脊髓星形胶质细胞内 c-fos 明显表达，在30 min、1、3、6 h 均显著高于对照($P<0.01$，$P<0.05$)，3 h 达到高峰(图 2)。



M：标准；1：对照；2－5：30 min，1 h，3 h，6 h

图 2　c-fos RT-PCR 结果

2.3　P38MAKP 信号在 SP 刺激脊髓星形胶质细胞分泌炎性因子中的作用

SP(10^{-7}mol/L)刺激可以刺激脊髓星形胶质细胞明显分泌炎性因子 TNF-α、IL-1β 和 NO ($P<0.01$)，SB203580 阻断 P38MAKP 信号通路后，TNF-α、NO 的分泌明显下降($P<0.01$)，而 IL-1β 的分泌在阻断前后无显著性差异($P>0.05$)，各组单纯 SB203580 阻断组和正常对照间均无明显差异($P>0.05$)(表 1)。

表 1　SB203580 阻断 P38MAKP 对 SP 刺激脊髓星形胶质细胞分泌 IL-1β、TNF-α 和 NO 的影响 (ng/ml，$n=3$，$\bar{x}\pm s$)

组别	IL-1β	TNF-α	NO
对照	0.126 ± 0.013	0.220 ± 0.013	97.5 ± 13.5
N + SB203580	0.115 ± 0.010	0.216 ± 0.014	96.0 ± 12.9
SP	0.205 ± 0.023[a]	0.505 ± 0.013[a]	682.5 ± 79.8[a]
SP + SB203580	0.194 ± 0.027	0.450 ± 0.012[b]	487.8 ± 60.3[b]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 SP 刺激组比较

3　讨论

星形胶质细胞在中枢不仅数量最多，而且具有结构和营养支持、再生修复与神经免疫等多种重要功能。研究证实，星形胶质细胞还通过信息传递、神经免疫和内分泌等方式，影响神经细胞的敏感性和分泌炎性致痛因子参与痛觉在中枢的调控，其功能受多种神经递质和细胞因子的调节，如 P 物质、谷氨酸和白介素等[4]，并可能涉及钙信号、P38MAPK 等信号转导途径。SP 可作用于多种细胞引起神经源性炎症反应，许多慢性神经痛中均伴有 SP 作用的增强[5]，因此，研究 SP 作用下脊髓星形胶质细胞的活化及其信号转导途径有助于了解痛觉在脊髓中枢传导和调控的细胞分子机制。

1993 年 Han 等首先在内毒素脂多糖刺激后的前 B 细胞中发现和克隆了 p38MAPK，分子量为 38×10^3，广泛分布于全身多种组织和细胞中，通过三级酶促级联作用，最终磷酸化靶蛋白，激活转录因子，调控一系列的基因表达，可能与细胞生长、发育、分裂、凋亡、细胞因子分泌等一系列生理和病理过程密切相关[6]，是细胞外刺激信号引起细胞核反应的主要通道之一。研究表明，P38 MAPK 可直接或通过介导细胞因子如肿瘤坏死因子(TNF-α)的产生而参与炎症过程和应激反应，用 LPS 刺激小鼠巨噬细胞后，可致巨噬细胞内 p38MAPK 的磷酸化，抑制其磷酸化可减轻甚至完全阻断巨噬细胞内 TNF-α 的产生[7]。P38MAKP 的作用可以被 SB203580、SB216995、SB220025 和 VK199 等吡咯咪唑类复合物所抑制，其机制是通过与 p38MAPK 的高亲和力，抑制它们对转录因子或下游蛋白酶的进一步活化。SB203580 等可以通过对 p38MAPK 的抑制阻断多种炎症介质，如 TNF-α、IL-1、IL-6、NO 等的产生，从而抑制炎症细胞的聚集或活化[8]。本研究显示，SP 刺激下脊髓星形胶质细胞 P38MAKP 明显磷酸化，在 15、30、45、60 min 均明显强于对照，表明 SP 可以促使脊髓星形胶质细胞中的 P38MAKP 信号明显活化。而且还显示 SP 刺激可以导致脊髓星形胶质细胞明显分泌炎性致痛因子 TNF-α、IL-1β 和 NO，SB203580 阻断 P38MAKP 信号通路后，除 IL-1β 外，TNF-α 和 NO 的分泌明显下降，表明 P38MAKP 信号参与了 SP 作用下脊髓星形胶质细胞活化和炎性致痛因子 TNF-α、NO 的分泌增加，多种周围慢性疼痛中均伴有致痛递质 SP 在中枢释放增多，高浓度 TNF-α、NO 具有明显的神经毒和致痛作用[9]，因此，P38MAKP 是 SP 作用下脊髓星形胶质细胞对周围痛觉调控和传导的重要信号转导途径。

c-fos 是对细胞的生长分化有重要意义的核内原癌基因，是刺激作用下最早的反应基因[10]，其表达产物 Fos 蛋白含 380 个氨基酸，具有亮氨酸拉链结构，能与 c-Jun 的产物 Jun 形成二聚体而构成有活性的转录因子 AP-1，与许多基因上游调控区的 AP-1 位点结合后调节靶基因的表达，因而是一种重要的基因表达和蛋白合成的调节因子，通常将 Fos 认为是第 3 信使，在胞内合成后又转位入核发挥调节作用。在外在病理刺激因素的作用下，c-fos 通过胞内 Ca^{2+}、Ca/CaM 激酶和 PKC 途径，MAPK 激活，对转录因子进行磷酸化等表达增加，相应基因表达上调，蛋白质的合成增多，诱发一系列效应，研究证实多种慢性疼痛均伴有脊髓背角 c-fos的表达升高[11]，本实验显示，在 SP 的作用下，脊髓星形胶质细胞的 c-fos 表达明显，并在 3 h 达到高峰，c-fos作为一种早期反应基因参与了 SP 作用下的脊

髓星形胶质细胞的活化，但 c-fos 在 SP 刺激下脊髓星形胶质细胞活化及炎性致痛因子分泌中的作用还有待进一步的研究。

参考文献：

[1] KUCHER B M, NEARY J T. Bi-functional effects of ATP/P2 receptor activation on tumor necrosis factor-alpha release in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes[J]. J Neurochem, 2005, 92(3): 525 - 535.

[2] WATKINS L R, MILLIGAN E D, MAIER S F. Glial activation: a driving force for pathological pain[J]. Trends Neurosci, 2001, 24(8): 450 - 455.

[3] JIN S X, ZHUANG Z Y, WOOLF C J, *et al*. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain[J]. J Neurosci, 2003, 23(10): 4017 - 4022.

[4] 李卉丽，秦绿叶，万 有，等. 疼痛研究的新亮点：星形胶质细胞[J]. 生理科学进展，2003，34(1)：45 - 48.

[5] TAYLOR B K, MCCARSON K E. Neurokinin-1 receptor gene expression in the mouse dorsal horn increases with neuropathic pain[J]. J Pain, 2004, 5(2): 71 - 76.

[6] LEE J C, LAYDON J T, MCDONNELL P C, *et al*. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis[J]. Nature, 1994, 372(6508): 739 - 746.

[7] KWAK H J, SONG J S, HEO J Y, *et al*. Roflumilast inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators via suppression of nuclear factor-kappaB, p38 mitogen-activated protein kinase, and c-Jun NH2-terminal kinase activation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 315(3): 1188 - 1195.

[8] OTERO M, LAGO R, LAGO F, *et al*. Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(3): R581 - R591.

[9] LEE H L, LEE K M, SON S J, *et al*. Temporal expression of cytokines and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model[J]. Neuroreport, 2004, 15(18): 2807 - 2811.

[10] MIKULA M, GOTZMANN J, FISCHER A N, *et al*. The proto-oncoprotein c-Fos negatively regulates hepatocellular tumorigenesis[J]. Oncogene, 2003, 22(43): 6725 - 6738.

[11] BURITOVA J, LARRUE S, ALIAGA M, *et al*. Effects of the high-efficacy 5-HT1A receptor agonist, F 13640 in the formalin pain model: a c-Fos study[J]. Eur J Pharmacol, 2005, 514(2 - 3): 121 - 130.

[12] 张 恒，周占松，刘丽梅，等. P 物质对脊髓星形胶质细胞活化和炎性因子 IL-1β、TNF-α 分泌的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(7)：681 - 684.

（编辑 汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)21-2166-01

急性百草枯中毒治疗方法的探讨

刘秋慧 （郑州大学第一附属医院急救中心，郑州 450052）

百草枯(paraquat，PQ)是在我国农村广泛使用的一种除草剂，其对人的毒性较强，中毒后病死率高达85%～95%[1]，目前尚无有效的解毒药物。现回顾性分析我院2001年1月至2005年5月收治的急性百草枯中毒患者30例，探讨治疗急性百草枯中毒的有效方法。

1 临床资料

1.1 病例选择

本组30例患者，男性9例，女性21例，年龄14～36(27±8.1)岁，均系口服中毒，口服PQ量5～50 ml，口服中毒至入院时间6～28 h。30例患者均有不同程度咽喉及胸骨后烧灼痛，口腔黏膜、舌黏膜充血糜烂，其中胸闷、呼吸困难者14例，腹胀、皮肤黏膜黄染3例，恶心呕吐25例，咯血1例，腹痛12例，发热3例。根据临床表现分为轻、中、重3种类型。

1.2 方法

按治疗方法不同将病人分为3组，A组8例采用洗胃、导泻、抗氧自由基治疗、静脉注射甲强龙40 mg每8小时1次及对症治疗。B组14例治疗同A组加用血液灌流。C组8例治疗同B组，将甲强龙改为首次500 mg，以后80 mg每8小时1次静脉注射。

1.3 统计学处理

数据 $x \pm s$ 表示，应用精确概率值法。

2 结果

3组急性百草枯中毒患者治疗结果见表1。

表1 3组急性百草枯中毒患者治疗结果比较

组别	例数(n)	中毒程度			治愈例数	病死例数
		轻	中	重		
A组	8	4	2	2	0	8
B组	14	3	8	3	2	12
C组	8	2	2	4	4*	4*

a：$P<0.05$，与A、B组比较

（下转2170页）

作者简介：刘秋慧(1959－)，女，河南省郑州市人，副主任医师，主要从事急性中毒方面的研究，发表论文20余篇。电话：0371-65165981，E-mail：liuqiuhui21@sina.com

收稿日期：2005-11-15；修回日期：2006-04-21