文章编号:1000-5404(2009)16-1573-04

论著

牛磺酸对重症急性胰腺炎大鼠枯否细胞 p38MAPK 信号转导通路的影响

黄庆勇,孙 科,欧志兵,陈蓁臻,龚建平,刘 川 (重庆医科大学附属第二医院肝胆外科,重庆 400010)

摘 要:目的 探讨牛磺酸对重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis,SAP)大鼠枯否细胞(KCs)P38MAPK 的影响以及对分泌促炎细胞因子 TNF-α 和 IL-1β 的作用。**方法** 48 只 SD 大鼠采用完全随机法分为假手术对照(SO)组、SAP 组、SAP + Taur(牛磺酸)组。SAP 模型通过胰胆管逆行注射 5% 牛磺胆酸钠诱导,造模前 SAP + Taur 组分别于 24、12 h 从尾静脉内注入牛磺酸(3 mmol/L,0.1 ml/100 g)。假手术或造模后分别于 12、24 h 处死动物,检测其血清中 AST、ALT、AMS 含量;分离 KCs,采用 Western blot 法检测 P38MAPK 活化情况,凝胶电泳迁移率法(EMSA)检测 KCs 中 NF-κB DNA 的表达,并用 ELISA 法检测 KCs 培养上清液中 TNF-α 和 IL-1β 蛋白含量。**结果** SAP 组大鼠血清中 AST、ALT、AMS 含量均较 SO 组明显升高($P<0.01$);而 SAP + Taur 组血清中 AST、ALT、AMS 含量与 SAP 组比较,明显降低($P<0.05$)。SAP 组各时间点大鼠 KCs 中 p38MAPK 活性显著高于 SO 组($P<0.01$),而且 NF-κB 的表达也明显高于 SO 组($P<0.01$),KCs 培养上清液中 TNF-α 和 IL-1β 蛋白含量明显高于 SO 组($P<0.01$),但 SAP + Taur 组大鼠 KCs 上述指标均显著低于 SAP 组。**结论** 牛磺酸可以抑制急性胰腺炎时 KCs 中 p38MAPK 的活化,减少 NF-κB 的表达,从而对促炎细胞因子 TNF-α 和 IL-1β 的分泌起抑制作用,可能具有临床应用前景。

关键词: 牛磺酸;胰腺炎;枯否细胞;有丝分裂素激活蛋白激酶
中图法分类号: R392.12;R576.02;R977.4 **文献标识码:** A

Effects of taurine on p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in Kupffer cells from severe acute pancreatitis rats

HUANG Qing-yong, SUN Ke, OU Zhi-bing, CHEN Zhen-zhen, GONG Jian-ping, LIU Chuan (Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of taurine on p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) signaling pathway and pro-inflammatory cytokines, tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-1β (IL-1β) in Kupffer cells (KCs) from severe acute pancreatitis (SAP) rats. **Methods** Sprague-Dawley rats were randomized into three groups: ① sham operation group (SO), ② SAP group, ③ SAP plus taurine group (SAP + Taur). The SAP model was created by retrogressive injection of 5% sodium taurocholate solution through the bili-pancreatic duct. Rats in SAP + taurine group were injected with taurine (3 mmol/L, 0.1 ml/100 g) through the vena caudalis at 12 and 24 h before the establishment of SAP model. Rats from each group were sacrificed at 12 and 24 h after sham operation or SAP treatment. The levels of serum transaminase and amylase were detected. Then KCs in each group were isolated. The activities of p38 MAPK and NF-κB DNA in KCs were detected by Western blotting and electrophoretic mobility assay respectively. The levels of TNF-α and IL-1β in the supernatant were determined by ELISA. **Results** In SAP group, the levels of serum transaminase and amylase were significantly higher than those in SO group ($P<0.01$), but in SAP + Taur group, they were significantly lower than those in SAP group ($P<0.05$). The activities of p38 MAPK and NF-κB in KCs in SAP rats were significantly higher than those in sham operation rats ($P<0.01$). SAP could also enhance the protein expressions of TNF-α and IL-1β in the supernatant ($P<0.01$). These events were significantly inhibited by treatment with taurine. **Conclusion** The inhibited activation of p38MAPK and the

作者简介:黄庆勇,男,湖北省咸宁市人,硕士,医师,主要从事胰腺炎与枯否细胞方面的研究。E-mail:huangqingyong1980@126.com
通信作者:刘 川,E-mail: gongjianping11@126.com
收稿日期:2008-11-12;修回日期:2008-12-17

down-regulated expression of NF-κB may contribute the inhibitory effect of taurine on the secretion of pro-inflammatory cytokines, TNF-α and IL-1β. Therefore, taurine may be of potential clinical application for the prevention and treatment of SAP.

Key words: taurine; pancreatitis; Kupffer cells; mitogen-activated protein kinase

牛磺酸(Taurine)又名2-氨基乙磺酸,是一种由含硫氨基酸转化而来的β-氨基酸,游离存在于人体内各种组织,是动物体内含量最为丰富的自由氨基酸[1]。越来越多的证据表明牛磺酸具有调节细胞钙稳定、清除氧自由基、抑制膜脂质过氧化、维持细胞渗透压、稳定细胞膜等多种作用。最近研究显示牛磺酸对急性胰腺炎肝枯否细胞有一定的抑制作用,使枯否细胞释放的炎症因子大大减少[1],但对其具体机制的研究很少。本研究观察牛磺酸对p38MAPK信号转导通路的影响,探讨其在KCs活化中的作用,为牛磺酸防治SAP时并发的SIRS和MOD提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

牛磺胆酸钠、牛磺酸、胶原酶、DNase Ⅰ、Nycodenz和3乳胶微粒(Simga公司),链霉蛋白酶E(Merck公司),HRP抗兔二抗(GenScript公司),P38磷酸化(Santa Cruz公司),内参actin(GenScript),NF-κB65(Santa Cruz公司),蛋白标准(Fermentas公司),TNF-α和IL-1β ELISA检测试剂盒(BioSource International公司)。

1.2 实验动物分组、模型复制及标本收集

健康成年的雄性Sprague-Dawley大鼠48只,清洁级,体质量250~300 g,购自重庆医科大学实验动物中心,采用完全随机法分为假手术对照(sham operation,SO组)组、重症急性胰腺炎(SAP组)组及牛磺酸(SAP+Taur组)组3组,每组16只。大鼠术前禁食12 h,造模前24、12 h SAP+Taur组分别经尾静脉注射牛磺酸(3 mmol/L,0.1 ml/100 g),而其他组给予同剂量的生理盐水。3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,常规备皮、消毒、铺巾,取上腹正中切口进入腹腔,以4号加工钝头头皮静脉针在胆胰管开口处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开口处将胆管两端钳闭,以0.2 ml/min速度注入5%牛磺胆酸钠(0.1 ml/100 g),注射完毕后保持5 min拔出穿刺针,去除动脉夹及结扎线,无损伤线缝合十二指肠穿刺处,两层关腹,假手术组开腹后仅翻动十二指肠并触摸胰腺数次,排除穿刺失败者,造模后分别于12、24 h经下腔静脉取血处死大鼠,3 000 r/min离心8 min,留取血清,并检测血清中AST、ALT、AMS含量,随后按下述方法分离出肝脏KCs。

1.3 KCs分离、培养和鉴定

KCs的分离参照文献[2]进行。胶原酶、链霉蛋白酶E和DNase Ⅰ联合进行肝脏原位灌注后,经Nycodenz不连续密度梯度离心和选择性粘附法分离KCs,KCs活性和鉴定分别采用台盼蓝拒染实验和乳胶微粒吞噬实验判断,结果表明分离的KCs活性和纯度均大于95%。

1.4 p38MAPK活化检测

采用Western blot法[3],具体操作步骤见试剂盒说明书,简述如下:取分离的枯否细胞加入细胞裂解液,2 000×g离心20 min,收集上清液,用Bradford法进行蛋白定量,然后进行免疫沉淀,育后行SDS-PAGE分离样品,电泳结束后电转移至硝酸纤维薄膜,封闭,后与1∶1 000稀释的抗磷酸化ATFhr71 4 ℃孵育过夜,再与抗兔-HRP二抗反应,后取试剂盒中底物液A液0.5 ml、B液0.5 ml混合,滴在硝酸纤维素膜上,振荡1 min,甩干,压膜,曝光,显影。照片在Fluors Mutilmager图像分析仪(Bio-Rad公司)上用Quantity One 4.1版像分析软件进行分析,以相应蛋白条带的平均光强度值(mean value intensity,MVI)来表示p38MAPK的活性。

1.5 EMSA检测KCs核NF-κB激活

按Surh[4]介绍的方法提取KCs核蛋白,参照Yamamoto等[5]介绍的方法进行EMSA测定。NF-κB寡核苷酸探针(序列为:5′-GCCTCCAATGTTCGCGAACTTTCC-3′)购于Santa Cruz生物公司。结果判定:测定每条电泳滞后带的相对光密度ROD×面积(mm^2)。所得结果表示核转录因子NF-κB与探针结合的相对量。

1.6 培养上清的TNF-α、IL-1β蛋白测定

采用大鼠TNF-α ELISA试剂盒和IL-1β ELISA试剂盒,均按说明书进行。

1.7 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.0统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠血清中AST、ALT、AMS含量

SAP组大鼠血清中AST、ALT、AMS含量明显高于假手术($P<0.01$)。牛磺酸干预后大鼠血清中AST、ALT、AMS含量较SAP组明显降低($P<0.05$),但仍高于假手术组($P<0.01$)。见表1。

表1 各组大鼠血清转氨酶、淀粉酶的变化(U/L, $n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别		AST	ALT	AMS
SO组	12 h	198.48±24.50	75.13±16.60	303.75±42.55
	24 h	286.46±28.32	109.50±24.40	368.88±74.81
SAP组	12 h	734.25±64.25[a]	308.75±31.50[a]	916.75±143.64[a]
	24 h	865.75±86.19[a]	368.13±35.88[a]	1 136.75±201.15[a]
SAP+Taur组	12 h	413.70±50.65[ab]	189.68±23.81[ab]	560.25±85.14[ab]
	24 h	530.75±50.50[ab]	241.13±26.67[ab]	757.27±116.75[ab]

a: $P<0.01$,与SO组比较;b: $P<0.05$,与SAP组比较

2.2 各组大鼠枯否细胞中p38MAPK的活化情况

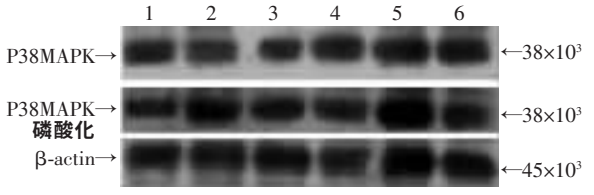
3组各时间点KCs中p38MAPK的蛋白量无明显差异($P>$

0.5),但各组 SAP 大鼠 KCs 的 p38MAPK 明显被活化为,其磷酸化水平明显增高,与 SO 组比较,差异非常显著($P<0.01$)。用牛磺酸干预后,其磷酸化水平大大下降,与 SAP 组相比,差异有统计学意义($P<0.05$),而且这种抑制作用在随时间延长而增强。见表 2、图 1。

表 2　各组大鼠 KCs 中 P38MAPK 的蛋白量及磷酸化水平($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	蛋白量		磷酸化	
	12 h	24 h	12 h	24 h
SO 组	0.839 9±0.036 5	0.844 7±0.068 1	0.343 8±0.021 5	0.421 4±0.048 4
SAP 组	0.753 9±0.044 5[a]	0.702 1±0.048 9[a]	0.985 2±0.089 7[a]	1.031 5±0.091 6[a]
SAP+Taur 组	0.750 6±0.058 6[b]	0.844 9±0.087 8[b]	0.571 3±0.081 9[b]	0.683 5±0.068 5[b]

a:$P<0.01$,与 SO 组比较;b:$P<0.05$,与 SAP 组比较



1: SO 组 12 h; 2: SAP 组 12 h; 3:SAP + Taur 组 12 h; 4: SO 组 24 h; 5: SAP 组 24 h; 6:SAP + Taur 组 24 h

图 1　Western blot 法检测 KCs 中 P38MAPK 的蛋白量及磷酸化

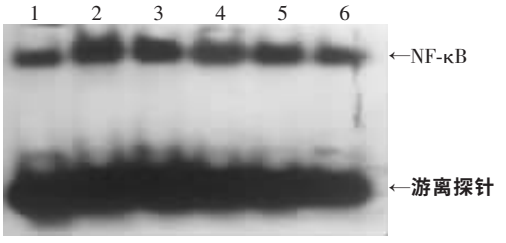
2.3　各组大鼠枯否细胞中的 NF-κB 激活情况

与 SO 组比较,各组 SAP 大鼠 KCs 中的 NF-κB 活性明显增强,其两者之间有显著差异($P<0.01$),但 SAP + Taur 组,其活性明显被抑制,与 SAP 组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 3、图 2。

表 3　各组大鼠 KCs 内 NF-κB DNA 活性变化($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	12 h	24 h
SO 组	86.63±17.44	103.61±11.07
SAP 组	224.28±22.67[a]	285.47±46.65[a]
SAP+Taur 组	165.93±16.59[b]	206.12±18.66[b]

a: $P<0.01$,与 SO 组比较; b: $P<0.01$,与 SAP 组比较



1: SO 组24 h; 2: SAP 组 24 h; 3:SAP + Taur 组 24 h; 4:SAP + Taur 组 12 h; 5: SAP 组 12 h; 6: SO 组 12 h

图 2　EMSA 法检测各组大鼠 KCs 中 NF-κB 的活性情况

2.4　各组大鼠枯否细胞培养上清液中的 TNF-α、IL-1β 含量

如表 4 所示,与 SO 组比较,SAP 组大鼠各时间点 KCs 培养上清液中 TNF-α、IL-1β 含量明显升高,两组比较有显著差异($P<0.01$),用牛磺酸干预后,各组 KCs 培养上清液中 TNF-α、IL-1β 含量明显下降,其值与 SAP 组比较有统计学差异($P<0.05$)。

表 4　各组大鼠 KCs 培养上清液 TNF-α、IL-1β 的变化

(pg/ml, $n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α		IL-1β	
	12 h	24 h	12 h	24 h
SO 组	201±35	238±51	247±48	431±61
SAP 组	885±157[a]	1 068±242[a]	798±144[a]	971±203[a]
SAP+Taur 组	551±176[b]	746±209[b]	467±57[b]	624±143[b]

a: $P<0.01$,与 SO 组比较; b: $P<0.05$,与 SAP 组比较

3　讨论

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是一种严重的疾病,总死亡率近似 10%,而重症急性胰腺炎的死亡率却高达 20%~30%。大部分患者的死因不是胰腺局部炎症或胰腺感染,而是胰腺炎后所产生的炎症细胞因子的大量释放,最终导致多系统功能衰竭的结果。过去人们一直认为这些细胞因子的来源是发炎的胰腺腺泡细胞和局部浸润的炎性细胞,近几年研究发现,KCs 在胰腺炎后炎症细胞因子的产生和其作用放大的过程中,起非常重要的作用[6]。Gloor 等[7]研究发现,阻断 KCs 功能后,急性胰腺炎血循环系统中的细胞因子显著降低,而且胰腺、肝、肺的组织损害也明显减轻,证明 KCs 来源的细胞因子对系统细胞因子水平的升高及其相关的器官损害起到了非常重要的作用。而且近年的研究表明在手术、应激、缺血再灌注等情况下 KCs 的激活主要是通过致有丝分裂素激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号转导通道介导的,其中尤其与 p38MAPK 关系密切[8]。任洪波等[9]研究发现 SAP 发生后大鼠 KCs 的 p38MAPK 显著活化,同时 TNF-α、IL-1β mRNA 的表达明显增强,而给予 p38MAPK 活化的抑制剂 CNI-1493 能明显抑制 p38MAPK 活化,同时明显减少 TNF-α,IL-1β mRNA 的表达,证实了 p38MAPK 信号转导通路参与了 SAP 大鼠 KCs 分泌促炎细胞因子 TNF-α、IL-1β。综上所述,KCs 在急性胰腺炎的发展中,具有非常重要的作用。于是如何抑制 KCs 的功能,减轻胰腺炎后炎症细胞因子的释放,成为当今防治胰腺炎、改善胰腺炎预后研究的新方向。

牛磺酸(Taurine)化学名为 2-氨基乙磺酸,是普遍存在于哺乳动物组织中的一种含硫的 β-氨基酸。现已发现 Taur 具有广泛的生物学功能,如调节细胞内外钙稳态、调节渗透压、稳定细胞膜、抗氧化、对外源化合物的解毒作用等[10]。肝脏是 Taur 重要的靶器官,Taur 与肝病的关系近来成为研究热点。最新研究显示 Taur 不仅有抑制肝星形细胞增殖[11]、抗转化生长因子 β 诱导的肝纤维化的作用[12],而且还具有调节肝脏巨噬细胞功能以及抑制枯否细胞激活、减少炎症细胞因

子的释放等作用[13-15]。综上所述,牛磺酸也有可能抑制重症急性胰腺炎时肝脏的 KCs 的功能,改善重症急性胰腺炎所引起的器官功能损害。为了验证以上假说,我们在重症急性胰腺炎模型建立之前 24 h 和 12 h 分别经大鼠尾静脉注入的牛磺酸(3 mmol/L,0.1 ml/100 g),观察造模后 12、24 h 大鼠血清 AST、ALT、AMS 的含量,并检测 KCs 中 P38MAPK、NF-κB 的活性情况以及 KCs 培养上清液中 TNF-α、IL-1β 含量。结果发现,与 SAP 组比较,SAP + Taur 组大鼠血清 AST、ALT、AMS 的含量明显降低;虽然 3 组大鼠 KCs 中 p38MAPK 的蛋白含量无明显改变,但 SAP + Taur 组 KCs 中 p38MAPK 的磷酸化水平和 NF-κB 的活性却明显降低,而且 KCs 培养上清液中 TNF-α、IL-1β 含量也较 SAP 组明显降低。

本实验证明了牛磺酸可以抑制重症急性胰腺炎 KCs 中 P38MAPK 的活化,使其核转录因子 NF-κB 的转录水平下降,减少促炎症细胞因子 TNF-α、IL-1β 的分泌,改善重症急性胰腺炎引起的器官功能损伤。Taur 由于磺酸基的存在,化学性质稳定,不参与蛋白质的生物合成,因而在细胞内呈游离状态,而且无抗原性、无毒性、吸收好,有了这些特性,相信牛磺酸在防治急性胰腺炎特别是重症胰腺炎的方面将会越来越受到人们的重视。

参考文献:

[1] Bouckenooghe T, Remacle C, Reusens B. Is taurine a functional nutrient? [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006, 9(6): 728-733.

[2] Olynyk J K, Clarke S L. Isolation and primary culture of rat Kupffer cells[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1998, 13(8): 842-845.

[3] Schett G, Zwerina J, Firestein G. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2008, 67(7): 909-916.

[4] Surh Y J. NF-kappa B and Nrf2 as potential chemopreventive targets of some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities [J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2008, 17(Suppl 1): 269-272.

[5] Yamamoto M, Takeda K. Role of nuclear IkappaB proteins in the regulation of host immune responses [J]. J Infect Chemother, 2008, 14(4): 265-269.

[6] 周一农, 黄鹤光, 李 潛, 等. 甲基强的松龙对重症急性胰腺炎大鼠脑组织神经细胞凋亡的影响[J]. 中华消化外科杂志, 2008, 7(6): 419-421.

[7] Gloor B, Todd K E, Lane J S, *et al*. Hepatic Kupffer cell blockade reduces mortality of acute hemorrhagic pancreatitis in mice[J]. J Gastrointest Surg, 1998, 2(5): 430-435.

[8] Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(8): 1358-1375.

[9] 任洪波, 李兆申, 许国铭, 等. p38MAPK 在重症急性胰腺炎大鼠枯否细胞分泌促炎细胞因子中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(7): 923-926.

[10] Oja S S, Saransaari P. Pharmacology of taurine[J]. Proc West Pharmacol Soc, 2007, 50: 8-15.

[11] Chen Y X, Zhang X R, Xie W F, *et al*. Effects of taurine on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells *in vitro*[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2004, 3(1): 106-109.

[12] Kato J, Ido A, Hasuike S, *et al*. Transforming growth factor-beta-induced stimulation of formation of collagen fiber network and anti-fibrotic effect of taurine in an *in vitro* model of hepatic fibrosis [J]. Hepatol Res, 2004, 30(1): 34-41.

[13] Balkan J, Parldar F H, Dogru-Abbasoglu S, *et al*. The effect of taurine or betaine pretreatment on hepatotoxicity and prooxidant status induced by lipopolysaccharide treatment in the liver of rats[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005, 17(9): 917-921.

[14] Kincius M, Liang R, Nickkholgh A, *et al*. Taurine protects from liver injury after warm ischemia in rats: the role of kupffer cells[J]. Eur Surg Res, 2007, 39(5): 275-283.

[15] Schemmer P, Liang R, Kincius M, *et al*. Taurine improves graft survival after experimental liver transplantation [J]. Liver Transpl, 2005, 11(8): 950-959.

(编辑 龙 亮)

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是:凡是可以使用阿拉伯数字,而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字:

1 公历世纪、年代、年、月、日和时刻 例如:公元前 5 世纪、20 世纪 90 年代、1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全称,1995 年不能写成 95 年或 95′年;1953-1958 年不能写成 1953-58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用":"分隔的形式。如:13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2 计数和计量(整数、小数、分数、百分数、均数)包括序数、编号 4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法,不用"千分撇",节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙(如 2,431 改为 2 431)。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节,也不加千分撇。尾数"0"多,5 位以上的数字,可以用"万""亿"表示,但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示,例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部