论著

文章编号:1000-5404(2010)18-1958-04

高温致金黄地鼠神经管畸形中 p38MAPK、Bax 的表达变化

徐兴欣[1],马金龙[1],高彦丽[1],安凤仙[1],朱永方[2] (250021 济南,山东大学附属省立医院病理科[1];230001 合肥,安徽医科大学附属省立医院泌尿外科[2])

【摘要】 **目的** 探讨 p38MAPK 蛋白激酶及 Bax 在高温致神经管畸形中的分子机制。**方法** 将雌性金黄地鼠 72 只按完全随机设计分组法分为正常对照组和高温致神经管畸形实验组,每组 36 只。孕鼠于妊娠第 8 天进行高温水浴,并分别于高温后 2、8、16、24、48、72 h 取出胚胎。Western blot 法对 p38MAPK、P-p38MAPK 及 Bax 活性进行分析。**结果** ① Bax 在正常对照组胚胎稳定表达,且无明显量的改变($P>0.05$);Bax 的表达在高温后 8~48 h 明显升高,与正常对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$),于 8、16 h 时表达增加最为显著($P<0.01$)。② p38MAPK 及 P-p38MAPK 在正常组中稳定低表达;而在高温致畸组中,p38MAPK 的表达无明显变化($P>0.05$),P-p38MAPK 的表达在高温后 8~48 h 均明显高于相应时间点的正常组($P<0.05$),于 16 h 时表达增加最为显著($P<0.01$)。**结论** 高温能促进 p38MAPK 蛋白激酶及其凋亡蛋白 Bax 的表达,诱发胚胎的细胞凋亡,导致神经管畸形的发生。

【关键词】 高温;神经管缺损;丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶类;bcl-2 相关 X 蛋白质;金仓鼠
【中图法分类号】 R394.3;R714.431;R363.123 【文献标志码】 A

Expressions of p38 mitogen-activated protein kinase and Bax in hyperthermia-induced neural tube defects in golden hamsters

Xu Xingxin[1], Ma Jinlong[1], Gao Yanli[1], An Fengxian[1], Zhu Yongfang[2] ([1]Department of Pathology, Provincial Hospital of Shandong Province, Shandong University, Jinan, Shandong Province, 250021; [2]Department of Urology, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei, Anhui Province, 230001, China)

【**Abstract**】 **Objective** To explore the molecular mechanism of p38 mitogen-activated protein kinase and Bax in the development of neural tube defects induced by hyperthermia. **Methods** Totally 72 pregnant golden hamsters were randomly divided into 2 groups, group 1 (normal control) and group 2 (hyperthermia-induced neural tube defects). Water bath at 37 or 42 ℃ for 20 min was respectively given to the hamsters of group 1 or group 2 at gestational day 8. The pregnant golden hamsters were sacrificed at 2, 8, 16, 24, 48, and 72 h after water bath ($n=6$ for each time point), and the embryos were taken out for brain tissues. Changes in p38MAPK, P-p38MAPK and Bax expression were detected by Western blot analyses using special antibodies directed against p38MAPK and Bax. **Results** Bax was steadily expressed in control group at all time points. The expression was obviously increased in the hyperthermia group at 8 to 48 h after water bath, with a significant difference with the corresponding control groups ($P<0.05$), and the peak appeared at 8 and 16 h ($P<0.01$). P-p38MAPK activity was increased compared with the control group in the hyperthermia group at 8 to 48 h ($P<0.05$), and the peak appeared at 16 h ($P<0.01$). In contrast, the level of total p38MAPK was not changed in the whole course of experiment. **Conclusion** Hyperthermia may promote the expressions of p38MAPK and Bax during development, induce excessive apoptosis in embryo, and thereby result in the development of neural tube defects.

【**Key words**】 hyperthermia; neural tube defects; mitogen-activated protein kinase phosphatases; bcl-2-associated X protein; mesocricetus

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30560045). Corresponding author: Ma Jinlong, E-mail: majinlong123@yahoo.com.cn

高温是一种最常见的物理致畸因子,在自然环境、劳动环境及某些疾病中经常出现,且难以预防,可引起多种动物和人类先天性畸形的发生,在高温条件下,胚胎出现的发育缺陷主要累及心血管、神经系统、骨骼及眼等器官。在人类,高温诱导的出生缺陷以神经管畸形(neural tube defects,NTDs)最为常见[1]。神经管畸形是一类最为常见的先天畸形,也是胚胎、围生儿致残

【基金项目】 国家自然科学基金(30560045)
【通信作者】 马金龙,E-mail:majinlong123@yahoo.com.cn

和死亡的重要原因，主要表现为无脑畸形、脊柱裂、脑膨出和脑积水等。流行病学调查[2]显示，NTD 的发生率为 1‰～3‰，我国每年约有 10 万左右的 NTDs 患儿出生，严重影响了人口出生质量，给家庭和社会带来了巨大的精神压力和沉重的经济负担。新近研究[3]发现，高温刺激诱导细胞凋亡涉及细胞信号转导途径发生功能障碍，但其详细的作用机制尚需深入阐明。p38MAPK（mitogen activated protein kinase）信号转导蛋白激酶在受到不同的外界刺激后被磷酸化激活，进而磷酸化下游不同的底物，最终调节细胞的增殖、分化和凋亡等分子生物学事件[3]。高温致神经管畸形的发生很可能以 p38MAPK 信号通路功能失调为分子基础。本研究在吕锋等[4]建立的高温致 NTD 动物模型上，采用 Western blot 方法检测了正常发育中的神经管和高温致畸胚的神经管中 p38MAPK、Bax 的表达情况，以观察 p38MAPK、Bax 在神经管正常发育中的作用及其与高温致 NTD 之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物及高温致畸处理

成年未经产雌性金黄地鼠 72 只，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，体质量（100 ± 10）g，鼠颗粒饲料喂养，常规饮水。于晚 19:00－21:00 时与雄鼠合笼，次日做阴道涂片，查有精子者定为受精第 1 天。

将 72 只孕鼠按完全随机设计分组法分为实验组和对照组，每组 36 只，实验组于受精第 8 天 15:00，置 42 ℃水浴，持续 20 min，然后将其分为 6 个时相点，每个时相点 6 只，分别于处理后 2、8、16、24、48、72 h 剖腹取胎，在解剖镜下分离新鲜大脑组织，液氮速冻后于 －80 ℃保存。对照组取 36 只于同样时间进行水浴处理，水温为 37 ℃，持续 20 min。对照组在相应时间取材。

1.2 主要试剂

蛋白提取试剂盒购碧云天生物技术研究所，兔 Phosphor-p38MAPK 一抗购自美国 Cell Signaling 公司产品，兔 p38MAPK、兔 Bax、鼠 β-actin 一抗、辣根酶标志的山羊抗兔二抗（H + L）、辣根酶标志的山羊抗鼠二抗（H + L）购自北京中杉公司，蛋白预染 Marker 购自 Fermentas 公司，SuperECL Plus 超敏发光液购自美国 Millipore 公司。

1.3 Western blot 检测

将取出的实验组和对照组胚胎脑组织放置于冰上，并用冷生理盐水冲洗，加入适量裂解液（含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂）冰上裂解后超声匀浆，4 ℃离心 30 min，提取各组胚胎脑组织细胞蛋白质。用 mini-PROTEAN 电泳装置（Bio-Rad）将 80 μg 变性好的蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳。利用 mini-PROTEAN 蛋白转印装置，采用 100 V、48 min 将蛋白转印至 Nitrocellose membranes（NC）膜上。转印后 NC 膜先用丽春红（Ponceau S）染色液进行蛋白染色检测，然后在室温封闭 1 h。分别加兔 p38MAPK 一抗（1∶500 稀释）、兔 Phosphor-p38MAPK 一抗（1∶1 000 稀释）、兔 bax 一抗（1∶500 稀释）、鼠 β-actin 一抗（1∶500稀释），4 ℃摇床孵育过夜。第 2 天回收一抗，NC 膜用 TBST 漂洗 3 次后，加辣根酶标志的山羊抗兔二抗（1∶5 000 稀释）和辣根酶标志的山羊抗鼠二抗（1∶5 000 稀释）室温孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次后膜与化学发光剂 ECL 反应，经 LAS-4000 mini 型发光成像分析仪曝光显影。

1.4 图像分析及统计学分析

Western blot 的结果采用 Multi Gauge V 3.2 图像分析软件进行积分光密度值分析。以同一标本的 β-actin 积分光密度值作为内参，校正各目的蛋白的积分光密度值，按照公式计算目的蛋白的相对值（目的蛋白积分光密度值/β-actin 积分光密度值）。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 17.0 统计软件对实验组和对照组的积分光密度值进行 t 检验。

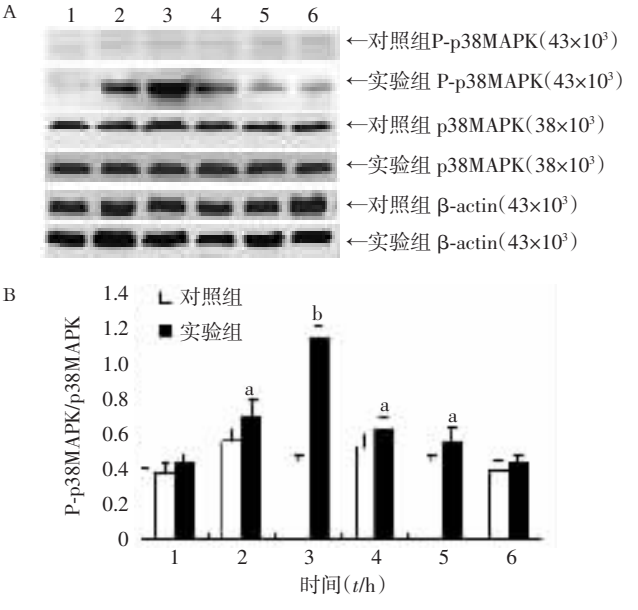
2 结果

2.1 胚胎的观察

正常对照组孕鼠的胚胎均为活胎。活胎的头部脑泡完全闭合，外观胚胎较饱满，可见眼泡、耳泡，脊柱表面也光滑无裂口，尾部弯曲细长。对照组孕鼠的死胎明显增多，可见各种形态的 NTDs（如脑膨出、无脑及脊柱裂等），面部形态异常和短尾或无尾等。高温处理后，胚胎 NTDs 发生率高达 78.87%。

2.2 磷酸化 p38MAPK 活性分析

应用 p38MAPK 抗体和特异性抗磷酸化蛋白激酶 p38MAPK 抗体，检测 p38MAPK 和 P-p38MAPK 活性和功能状态。结果表明，对照组中 p38MAPK 和 P-p38MAPK 在各时间段稳定表达，且无明显量的变化（$P > 0.05$）；在实验组，p38MAPK 的表达无明显变化（$P > 0.05$），而 P-p38MAPK 活性在高温后8～48 h 明显增加，至 16 h 升至最高值，实验组与对照组有明显差异（$P < 0.05$），至高温水浴后 72 h 恢复至对照组水平（图 1）。



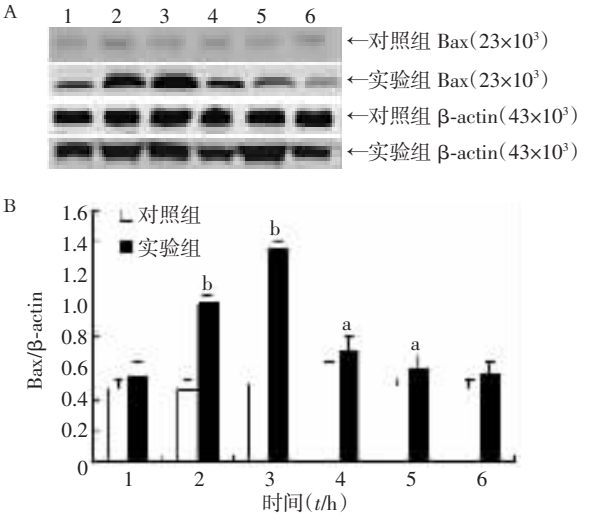
1∶2 h；2∶8 h；3∶16 h；4∶24 h；5∶48 h；6∶72 h

A：Western blot 检测结果；B：半定量分析结果 a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与对照组比较

图 1 不同水浴时间胚胎神经管畸形中 P-p38MAPK/p38MAPK 的表达

2.3 Bax 活性分析

应用特异性 Bax 抗体，检测 Bax 活性和功能状态。结果表明，Bax 在对照组各时间段稳定表达，且无明显量的变化（$P>0.05$）；Bax 活性在高温后 8～48 h 明显升高，至 8、16 h 升高最显著，实验组与对照组有明显差异（$P<0.05$），至高温水浴后 72 h 恢复至对照组水平（图 2）。



1：2 h；2：8 h；3：16 h；4：24 h；5：48 h；6：72 h

A：Western blot 检测结果；B：半定量分析结果　a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

图 2　不同水浴时间点胚胎神经管畸形中 Bax 的表达

3　讨论

胚胎发育是一个受基因严密调控的过程，致畸原可通过直接或间接干扰已知或未知发育关键基因的表达[5]，如发育基因、受体基因、生理因子基因以及原癌基因等。高温可引起这些基因的低表达、不表达或超表达，使某些与细胞分化相关的蛋白，特别是酶蛋白和信息蛋白异常，从而使细胞分化异常，最终引起畸形。刘雯等[6]建立的高温致神经管畸形模型结果表明，金黄地鼠神经管的闭合时间为受精第 8 天上午 8：00－9：00 至第 9 天上午 8：00－9：00，在此期间给予孕鼠 42 ℃、持续 20 min 高温处理，金黄地鼠胚胎的畸形发生率高达 78.28%，此实验结果与吕锋等[4]建立的高温致神经管畸形模型结果相一致。并且吕锋等通过形态学观察，研究了不同温度在不同持续时间对金黄地鼠胚胎发育的影响，建立了稳定的高温致金黄地鼠 NTDs 的动物模型。

近年研究发现，p38MAPK 信号通路主要参与应激条件下细胞的凋亡、免疫调节、细胞分化及炎症反应过程[7]。金鑫等[8]报道 p38MAPK 磷酸化水平在 Ox-LDL 处理后明显增强，可能介导下游与细胞凋亡，氧化损伤等相关基因的表达，在内皮细胞氧化应激损伤中起重要作用。Giordano 等[9]研究显示：在软骨藻酸诱导小鼠颗粒神经元凋亡过程中，p38MAPK 被快速磷酸化激活。以特异性阻断剂 SC68376 处理不仅可抑制 p38MAPK 磷酸化，而且阻抑小鼠颗粒神经元凋亡，说明 p38MAPK 参与了小鼠颗粒神经元凋亡过程。Mirkes 等[10]在建立 43 ℃高温处理 E9 鼠胚动物模型中证实高温诱导的 p38MAPK 活性在高温处理中鼠胚的头部、心脏和躯干被快速激活增强，提示高温通过改变 p38MAPK 信号通路引起凋亡性细胞死亡。有文献报道，在 p38MAPK 发挥作用的过程中，Bcl-2/Bax 是其重要的环节，p38MAPK 通路与凋亡蛋白 Bax 有交互作用，而 Bax 是凋亡通路中的重要一员[11]。在高温应激条件下，p38MAPK 凋亡信号转导通路发生改变，导致其苏氨酸和酪氨基酸残基发生磷酸化。P-p38MAPK 的活性升高，介导凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 等异常表达，可逐级激活效应分子 Caspase-3 的表达，就可能干扰胚胎器官形成的正常程序引起胚胎发育过程中特定区域细胞凋亡过度，从而导致胚胎先天缺陷的发生，这可能是高温致畸的重要途径[12]。最新研究证明高温刺激能促使 JNK1/2 发生磷酸化和凋亡基因 Caspase-3 的活化，是高温致胚胎先天性畸形的原因之一[13]。JNK/SAPK 及 p38MAPK 为 MAPK 家族应激激活的蛋白激酶，这 2 条通路的激活参与多种应激所介导的细胞凋亡。说明 p38MAPK 确实与高温致神经管畸形关系密切。

国外有研究表明高温抑制细胞增殖促进细胞凋亡涉及到凋亡基因家族 Bax 和 Bcl-2[14]。已有研究表明，细胞凋亡参与了高温致神经管畸形病理改变。马金龙等[15]证实了细胞凋亡在高温致神经管上皮细胞凋亡中的作用。在高温致金黄地鼠神经管畸形模型中，高温处理后 8 h，神经上皮排列紊乱，细胞凋亡增多。高温后 16 h，神经上皮和周围间充质细胞凋亡数明显增加。并有大量凋亡小体出现。而且免疫组化方法显示凋亡调控因子 Bcl-2、Bax 也主要表达于神经管上皮细胞，前者表达减少、后者表达增多，提示二者共同调节神经管上皮细胞凋亡，神经管上皮细胞凋亡可能是高温致神经管畸形的主要原因。以上资料说明 Bax 参与了高温致神经管畸形的过程，并与本实验结果相吻合。但是，p38MAPK 信号转导途径是否与神经管上皮细胞凋亡有关，尚少报道。

在本实验中我们观察了高温致金黄地鼠神经管畸形模型胚胎组织磷酸化 p38MAPK 及其 Bax 蛋白表达情况。结果表明，正常组胚胎组织磷酸化 p38MAPK 蛋白有较低水平的表达，而在高温致神经管畸形模型 8～48 h 中磷酸化 p38MAPK 在胚胎组织有较高水平的表达，且随着高温处理后时间的延长逐渐增多，16 h 达高峰，随后稍下降。与细胞凋亡密切相关的 Bax 蛋

白在高温处理后的表达也呈逐渐增多趋势，于 8、16 h 达高峰。Bax 蛋白是重要的凋亡促进蛋白，Bcl-2/Bax 异二聚体则使细胞易于凋亡，高温时 p38MAPK 的活化可以使 Bax 表达上调，表明二者之间存在一定的正相调控，高温可能就是通过影响 p38MAPK 再作用于 Bax 而发挥促进胚胎细胞凋亡的作用，诱导神经管畸形的发生。

参考文献：

[1] Czeizel A E, Puho E H, Acs N, *et al*. Delineation of a multiple congenital abnormality syndrome in the offspring of pregnant women affected with high fever-related disorders: a population-based study [J]. Congenit Anom (Kyoto), 2008, 48(4): 158 - 166.

[2] Kondo A, Kamihira O, Ozawa H. Neural tube defects: prevalence, etiology and prevention[J]. Int J Urol, 2009, 16(1): 49 - 57.

[3] Gaitanaki C, Mastri M, Aggeli K, *et al*. Differential roles of p38-MAPK and JNKs in mediating early protection or apoptosis in the hyperthermic perfused amphibian heart[J]. J Exp Biol, 2008, 211(Pt 15): 2524 - 2532.

[4] 吕锋，高英茂，管英俊. 高温致神经管畸形动物模型的建立及其形态发生的研究[J]. 解剖学报，1996，27(3)：273 - 277.

[5] Naha N, Lee H Y, Naser M I, *et al*. Ethanol inhibited apoptosis-related RNA binding protein, Napor-3 gene expression in the prenatal rat brain[J]. Med Sci Monit, 2009, 15(1): BR6 - BR12.

[6] 刘雯，马金龙，林万润，等. MAPKs 信号转导蛋白在高温致神经管畸形中的表达[J]. 中国病理生理杂志，2010，26(3)：472 - 476.

[7] Raman M, Chen W, Cobb M H. Differential regulation and properties of MAPKs[J]. Oncogene, 2007, 26(22): 3100 - 3112.

[8] 金鑫，易龙，陈春烨，等. 膜电位及 MAPK 磷酸化在飞燕草素抑制 Ox-LDL 诱导的血管内皮细胞氧化损伤中的作用[J]. 第三军医大学学报，2009，31(9)：1854 - 1858.

[9] Giordano G, Klintworth H M, kavanagh T J, *et al*. Apoptosis induced by domoic acid in mouse cerebellar granule neurons involves activation of p38 and JNK MAP kinases[J]. Neurochem Int, 2008, 52(6): 1100 - 1105.

[10] Mirkes P E, Wilson K L, Cornel L M. Teratogen-induced activation of ERK, JNK, and p38 MAP kinases in early postimplantation murine embryos[J]. Teratology, 2000, 62(1): 14 - 25.

[11] Owens T W, Valentijn A J, Upton J P, *et al*. Apoptosis commitment and activation of mitochondrial Bax during anoikis is regulated by p38MAPK[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(11): 1551 - 1562.

[12] Little S A, Kim W K, Mirkes P E. Teratogen-induced activation of caspase-6 and caspase-7 in early postimplantation mouse embryos[J]. Cell Biol Toxicol, 2003, 19(4): 215 - 226.

[13] 刘雯，马金龙，高彦丽，等. JNK1/2 通路蛋白及凋亡基因 Caspase-3 在高温致神经管畸形作用中的表达[J]. 山东大学学报：医学版，2009，47(12)：46 - 49.

[14] Basile A, Biziato D, Sherbet G V, *et al*. Hyperthermia inhibits cell proliferation and induces apoptosis: relative signaling status of P53, S100A4, and Notch in heat sensitive and resistant cell lines[J]. J Cell Biochem, 2008, 103(1): 212 - 220.

[15] 马金龙，高英茂，刘凯，等. Bcl-2、Bax 在高温致神经管畸形发生中的表达[J]. 山东大学学报：医学版，2005，43(9)：799 - 802.

（收稿 2010-05-06 修回 2010-05-15）

（编辑 张 维）

（上接 1944 页）

则更为罕见，这些可能不起源于硬脑膜而起源于脑微血管结构和脉络丛周围的间充质细胞[3]。最近 Clarencon 等[4]报道了最大的 1 组共 9 例颅内 SFT，其中 7 例起源于脑膜（其中 1 例发生于桥小脑角区），2 例位于脑室内。本例发生于右侧桥小脑角区，属于源于脑膜的 SFT。

颅内 SFT 的 CT 表现与颅外 SFT 相似，常表现为边界清楚的卵圆形或分叶状等密度软组织肿块，很少有钙化，增强后明显强化[5]。本例 CT 表现类似。MRI 检查 T_1WI 常与肌肉等信号，T_2WI 主要表现低信号，这与其纤维间质构成有关；增强后肿块呈均匀或不均匀强化，这与细胞构成、间质成分和变性等有关[5,6]。这种 T_2WI 低信号，增强后显著强化据认为是颅内 SFT 的特征性表现[4,5]。本例 MRI 表现符合这种特征性表现。有关颅内 SFT 弥散成像的报道非常少，Clarencon 等[4]的报道中 3 例行弥散成像检查，其中 2 例肿块中部分表现弥散受限，由于脑外肿瘤很少表现弥散受限，故其认为弥散受限的表现有助于 SFT 的诊断。本例弥散成像病变内无弥散受限表现。

颅内 SFT 应与脑膜瘤、神经鞘瘤、血管外皮细胞瘤和其他一些脑外肿瘤鉴别。“硬膜尾征”尽管也可见于颅内 SFT，但脑膜瘤等其他脑外肿瘤更常见。故缺乏“硬膜尾征”会有助于颅内 SFT 的诊断[4]。本例发生在桥小脑角区，应该与听神经瘤、脑膜瘤等鉴别[7]，T_2WI 相对特征性的稍低信号、显著强化而无“硬膜尾征”等有助于鉴别。这也提醒我们，在桥小脑角区脑外肿瘤的鉴别诊断中，SFT 应纳入鉴别之列。

参考文献：

[1] Klemperer P, Rabin C B. Primary neoplasms of the pleura. A report of five cases[J]. Arch Pathol, 1931, 11: 385 - 412.

[2] 陆明，郭德玉，王健. 胸膜外孤立性纤维瘤的 CT 表现和病理对照[J]. 临床放射学杂志，2008，27(1)：128 - 131.

[3] Kim K A, Gonzalez I, McComb J G, *et al*. Unusual presentations of cerebral solitary fibrous tumors: report of four cases[J]. Neurosurgery, 2004, 54(4): 1004 - 1009.

[4] Clarencon F, Bonneville F, Rousseau A, *et al*. Intracranial solitary fibrous tumor: Imaging findings[J]. Eur J Radiol, 2010. (in press).

[5] Ganly I, Patel S G, Stambuk H E, *et al*. Solitary fibrous tumors of the head and neck: a clinicopathologic and radiologic review[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2006, 132(5): 517 - 525.

[6] Motoori K, Hanazawa T, Yamakami I, *et al*. Intra- and extracranial solitary fibrous tumor of the trigeminal nerve: CT and MR imaging appearance[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2010, 31(2): 280 - 281.

[7] 谢文全，郭德玉，阎晓初，等. 8 例孤立性纤维性肿瘤临床病理、免疫组化特点[J]. 第三军医大学学报，2007，29(18)：1801 - 1804.

（收稿 2010-08-17 修回 2010-08-28）

（编辑 王 红）