



P38 MAPK 信号通路在西洛他唑保护大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用

黎建先¹, 蔡林², 李志峰¹, 陈勇¹ (1. 湖南省岳阳市第二人民医院神经外科, 湖南岳阳 414000; 2. 温州医学院附属第一医院, 浙江温州 325000)

摘要: **目的** 探讨西洛他唑对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其作用机制。**方法** 将45只成年雄性SD大鼠按随机数字表法分成假手术组、模型组、西洛他唑组, 每组15只, 通过大脑中动脉阻塞法建立起脑缺血再灌注模型。按照Longa EZ法评估动物神经功能; 检测各组大鼠脑组织含水量; 采用Western blot法检测半胱氨酸蛋白酶3 (caspase-3) 及丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号传导通路相关蛋白的表达。**结果** 与假手术组相比较, 模型组神经功能评分和大脑脑组织含水量均升高, 差异有统计学意义; 西洛他唑组的神经功能评分和大脑脑组织含水量较模型组均降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比较, caspase-3 和 MAPK 信号传导通路中 p-P38 的表达水平在西洛他唑组中的增加降低 ($P < 0.05$), 而西洛他唑对 MAPK 信号传导通路中其他成员 p-ERK 和 p-JNK 的表达无明显影响。**结论** 西洛他唑对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用与抑制神经细胞凋亡有关, 其抗凋亡作用机制可能与抑制 P38 MAPK 信号传导通路途径有关。

关键词: 脑缺血再灌注 凋亡 P38

中图分类号: R743.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5187 (2016) 05-005-03

Protection of cilostazol on cerebral ischemia/reperfusion in rats via P38 MAPK pathway

Abstract: **Objective** To elucidate the anti-apoptotic protection and the mechanism of cilostazol on focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) in rats. **Methods** Forty-five healthy male SD rats were divided into three groups (n=15) for experiments: sham-operated group, ischemia/reperfusion (I/R) group, cilostazol group. Ischemia was induced by middle cerebral artery occlusion. The neurofunction was measured by Longa EZ method. The brain water content was determined. The expression of caspase-3, MAPKs, p-P38, p-ERK and p-JNK were detected by western blot. **Results** As compared with the sham-operated group, the score of neurofunction and content of brain water in I/R group were increased statistically. The score of neurofunction and content of brain water in cilostazol group were lower than that of I/R group. Compared with the I/R group, the expression of caspase-3 and p-P38 were down-regulation in cilostazol group. **Conclusion** Cilostazol has certain neuroprotective effect in rats after ischemia/reperfusion injury, which may be related to down-regulation of the level of P38 MAPK pathway.

Key words: cerebral ischemia reperfusion apoptosis p38

脑血管疾病作为人类最常见的死因之一, 严重危害患者的健康和生命, 其中缺血性脑卒中占全部脑卒中的大部分^[1], 而缺血再灌注损伤是大多数缺血性脑血管疾病的主要病理生理过程, 其发生机制尚未完全阐明。有研究表明, 缺血后神经元细胞凋亡参与了缺血性脑损伤的过程^[2], 因此, 抑制神经元细胞凋亡可减轻脑缺血损伤。

近年来研究发现西洛他唑作为一种选择性磷酸二酯酶3抑制剂, 可通过增加细胞内环磷酸腺苷含量和激活蛋白激酶A从而发挥抗血小板凝集和舒张血管的作用^[3], 本研究拟观察西洛他唑对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型中神经细胞凋亡的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物和材料

成年雌性SD大鼠, 体重(304.5±25.4)g, 由温州医学院动物实验中心提供; 西洛他唑(纯度>98%)购自Sigma公司; 免疫组化染色试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所; caspase-3、p-P38、p-ERK、p-JNK和β-actin抗体购自美国Epitomics公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒购自美国Sigma公司。

1.2 动物分组和模型制备

将SD大鼠按照随机数字表法分成3组: 假手术组、模型组、西

洛他唑组(40 mg/kg), 每组15只。按照Longa EZ^[5]等报道的线栓法制作大鼠右侧大脑中动脉闭塞模型, 以动物出现右眼Horner征为模型成功的标志, 阻断血流2 h后再灌注24 h, 成功建立缺血再灌注模型45只。假手术组仅将缝线插入后拔出, 不阻断大脑中动脉。西洛他唑在术前2 h和6 h分别经灌胃给药1次, 模型组和假手术组分别灌胃给予等量生理盐水。

1.3 神经功能评分

所有实验大鼠在手术清醒后自由饮食, 术后4 h、24 h和48 h根据Longa EZ法分别进行神经功能评分: 0分, 无明显神经功能缺损; 1分, 提尾时不能伸展左前肢; 2分, 行走时向左侧旋转; 3分, 行走时向左侧倾斜; 4分, 不能自主活动或伴意识障碍。大鼠清醒后首次评分在1~3分者为造模成功, 作为本次实验用大鼠。

1.4 检测脑组织含水量

各组实验大鼠在实验结束后, 戊巴比妥钠麻醉后断头取脑, 将大脑半球自中线切开, 切取血肿周围脑组织, 滤纸吸干脑组织表面水分及血渍, 称取脑湿重(g)后至60℃烤箱中干燥48 h至恒重后称取干重(g), 计算脑含水量。

脑组织含水量 = (湿重 - 干重) × 100%

(接上页)

随着生命科学的不断发展, 微生物学也在迅速发展, 为适应21世纪的人才培养需要, 教师不仅要有广博的知识和科学研究能力, 而且具备现代化教育理论和教育科研能力, 运用教育学、心理学和教学研究成果指导教学改革。使学生在日益激烈的人才竞争中打下良好的基础, 已成为高职院校微生物教学工作面临的迫切任务^[10]。在教学过程中只有把知识传授和能力培养有机地结合起来, 提高教学效率, 使学生获得完整的知识体系和全面素质, 他们才能成为适应未来实际发展需要的高质量、高等技术人才。

参考文献

- [1] 叶辉. 微生物学实验教学改革与学生创新能力培养[J]. 实验室研究与探索, 2004, 23(2):58-59, 65.
- [2] 裴娟萍, 钟卫鸿, 土薇. 工科微生物学课程考核方法改革的初探[J]. 微生物学通报, 2002, 29(2):102-103.
- [3] 赵美琳, 郭巧丽. 基于能力观的高职课程模式分析[J]. 职业

技术教育, 2006, (20):25-27.

- [4] 余波. 生物技术专业微生物学教学改革的实践与探索[J]. 江西教育学院学报(自然科学版), 2000, 21(6):47-49.
- [5] 朱惠洪, 申婷, 何关仙. “微生物实践”课程运用PBL教学法的教学效果分析和评价[J]. 职教通讯, 2014(3):57-60.
- [6] 朱玉芳, 崔勇华. 动物学探究性实验的构建与思考[J]. 安徽农业科学, 2013(9):4229-4230.
- [7] 刘爱琳, 陈鸿秀. 合作学习小组的稳定性探析[J]. 集美大学学报, 2007(3):84-86.
- [8] 蔡慧琴. 关于探究性学习若干问题的思考[J]. 江西教育科研, 2005(6):15-16.
- [9] 白雪梅. 高职微生物学课程教学改革之初探[J]. 内蒙古教育, 2012(7):58-60.
- [10] 任长松. 探究式学习:18条原则[J]. 教育理论与实践, 2002(2):56-59.



1.5 Western blot 法检测脑组织中蛋白的表达

将液氮中保存的脑组织粉碎后加入 RIPA 裂解液裂解细胞, 提取上清液。用 Bradford 法测量蛋白浓度后取等量蛋白质样品 (20 μg/孔), 常规 8% SDS-PAGE 电泳, 半干转膜仪转膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 加入一抗 (1: 1000) 于 4 °C 下孵育过夜, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为第二抗体 (1: 2500) 室温孵育 1 h, ECL 显色, 条带曝光强度用 Quantity One 4.6.2 (BIO, RAD) 软件分析, 以 β-actin 为内参, 通过与内参的灰度比, 得出目的条带的相对表达水平。

1.6 数据的统计处理

实验所得结果均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件进行方差检验, 以 $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组神经功能缺损评分

与假手术组相比较, 模型组各时间点神经功能评分均显著升高, 在 24 h 时达到高峰 ($P < 0.05$); 与模型组相比较, 西洛他唑组在各时间点神经功能评分均降低 ($P < 0.05$)。(表 1)。

表 1: 各组大鼠在不同时间点的神经功能评分比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$, 分)

| 组别 | 4h | 24h | 48h |
|-------|---------------|---------------|---------------|
| 假手术组 | 0.00 ± 0.00* | 0.00 ± 0.00* | 0.00 ± 0.00* |
| 模型组 | 3.24 ± 0.35 | 2.87 ± 0.41 | 2.49 ± 0.25 |
| 西洛他唑组 | 0.60 ± 0.24*# | 0.80 ± 0.25*# | 0.50 ± 0.12*# |

注: 与模型组相比较, * $P < 0.05$; 与西洛他唑组相比较, # $P < 0.05$ 。

2.2 各组脑组织含水量

如表 2 所示, 与假手术组相比较, 模型组脑组织含水量明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比较, 西洛他唑组大鼠脑组织含水量明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2: 各组大鼠脑组织含水量的变化 (%), ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

| 组别 | 假手术组 | 模型组 | 西洛他唑组 |
|-----|--------------|----------------|----------------|
| 含水量 | 59.38 ± 9.67 | 87.34 ± 12.06* | 64.58 ± 8.34*# |

注: 与假手术组相比较, * $P < 0.05$; 与模型组相比较, # $P < 0.05$ 。

2.3 西洛他唑对大鼠脑组织细胞 MAPK 信号通路中 p-P38、p-ERK、p-JNK 以及 caspase-3 蛋白表达的影响

如图 1 所示, 与假手术组相比较, 模型组中 MAPK 信号通路调节蛋白 p-P38、p-ERK 和 p-JNK 以及 caspase-3 的表达均显著增加; 与模型组相比较, 西洛他唑作用后大鼠脑组织中 p-P38 的表达水平降低, 而西洛他唑对其他 MAPK 的调节蛋白如 p-ERK 和 p-JNK 的表达无明显变化; 同时西洛他唑组中 caspase-3 的表达明显下降, 与模型组相比较, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。

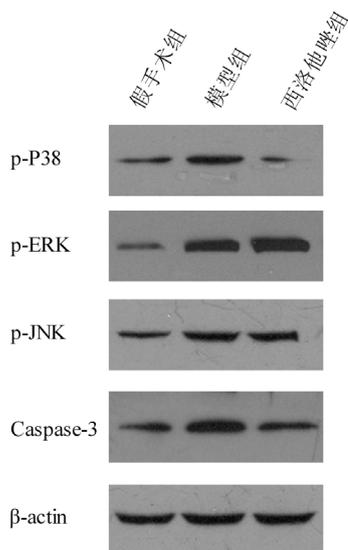


图 1: Western blotting 检测各组大鼠脑组织中 p-P38、p-ERK、

p-JNK 以及 Caspase-3 蛋白表达, 以 β-actin 为内参。

3 讨论

缺血再灌注损伤是一种常见、复杂的病理生理过程, 脑缺血再灌注后可产生一系列神经功能缺损的表现, 严重危害患者的生活质量, Longa EZ 法是在临床和科研实验中被广泛应用的神经功能评分法。在本研究中, 模型组大鼠出现明显对侧肢体运动障碍和意识障碍等神经功能损害的表现, 而假手术并未引起缺血再灌注, 因此没有出现神经功能缺损症状, 从而排除手术因素对大鼠神经学评分的影响, 而西洛他唑在各个时间点均可以有效改善缺血再灌注大鼠的神经症状, 表明西洛他唑对大鼠缺血再灌注损伤有确切的保护作用, 与文献报道相符^[4]。

脑组织缺血再灌注后继发的病理生理改变所造成脑细胞的损伤是脑缺血再灌注损伤的重要原因, 研究表明, 细胞凋亡是引起受损脑细胞死亡的主要机制之一^[5]。研究表明 Caspase-3 可通过细胞凋亡的线粒体通路、死亡受体通路和内质网应激通路来介导细胞凋亡^[6], 在本研究中, 模型组大鼠脑组织中 Caspase-3 表达较假手术组上调, 而西洛他唑作用后脑组织中 Caspase-3 表达减少, 表明西洛他唑对大鼠脑组织中神经细胞凋亡具有保护作用, 与大鼠脑出血后脑组织含水量结果相吻合, 表明, 西洛他唑可通过抑制细胞凋亡发挥脑组织缺血再灌注损伤的保护作用。

细胞凋亡是一个复杂的过程, 目前已知细胞凋亡有两条主要途径^[7]: 一是 TNF 受体家族成员参与的通过 caspase-8 活化途径, 称为外源性凋亡途径; 二是细胞色素 C 参与的通过 caspase-9 活化的途径, 称为内源性凋亡途径, 两条途径最后均激活下游效应因子 caspase-3 和 caspase-7 从而使细胞发生凋亡。但除 caspase 依赖的细胞凋亡通路外, 还存在不依赖 caspase 的凋亡通路, 如 MAPK 信号通路。MAPK 是细胞内丝氨酸 / 酪氨酸蛋白激酶家族。MAPK 信号通路中的成员 P38、ERK 和 JNK 等可以被各种细胞外信号激活, 引起细胞内的级联反应, 从而参与细胞周期的调节、细胞增殖和细胞凋亡等一系列生理及病理过程。大量研究表明, 阻断 JNK 通路可抑制细胞凋亡, 而阻断 ERK 通路可促进细胞凋亡; 而 P38 作为 MAPK 家族中重要成员, P38 的丝氨酸 / 酪氨酸残基可以被磷酸化而激活为 p-P38, 从而在细胞凋亡中发挥重要的作用, p-P38 表达增加可促进细胞凋亡^[7, 8]。在本研究中, 应用 western blot 法检测了 MAPK 家族中 3 种调节蛋白的变化, 结果表明, 模型组中 p-P38、p-ERK、p-JNK 以及 caspase-3 的表达较假手术组明显增加, 表明在缺血再灌注中, caspase 通路和 MAPK 通路可能都参与了神经细胞凋亡过程; 而经西洛他唑作用后 p-P38 表达水平显著降低, 而 p-ERK、p-JNK 的表达并没有发生改变, 而 caspase-3 的表达也经西洛他唑作用后降低。由此表明, 抑制 caspase-3 的表达以及阻断 P38 MAPK 信号通路的激活可能是西洛他唑抑制神经细胞凋亡的作用机制之一。

总之, 本次研究表明西洛他唑可通过抑制脑组织神经细胞凋亡, 同时对大鼠缺血再灌注神经功能损伤发挥一定保护作用, 其机制可能主要是通过抑制 caspase-3 的表达以及阻断 P38 MAPK 信号通路的激活而实现。本次实验结果为西洛他唑应用于临床治疗提供了更多的实验依据, 但需进一步实验研究西洛他唑调节 MAPK 信号通路的具体机制。

参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010[M]. 中国全科医学, 2011(35):4013-4017.
- [2] Smith WS. Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective[J]. J Vasc Interv Radio, 2004, 15(1 Pt 2):S3-12.
- [3] Jung KI, Kim JH, Park HY, et al. Neuroprotective effects of cilostazol on retinal ganglion cell damage in diabetic rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2013, 345(3):457-463.
- [4] Yu BC, Lee DS, Bae SM, et al. The effect of cilostazol on the expression of matrix metalloproteinase-1 and type I procollagen in ultraviolet-irradiated human dermal fibroblasts[J]. Life Sci, 2013, 92(4-5):282-288.
- [5] Shi SS, Yang WZ, Tu XK, et al. 5-Lipoxygenase Inhibitor Zileuton Inhibits Neuronal Apoptosis Following Focal Cerebral Ischemia[J]. Inflammation, 2013, 33(2):253-257.

(转下页)



乳牙急性根尖周炎 2 种首诊治疗方法的对比研究

刘秀珍 (黑龙江省大庆市肇州县中医院口腔科, 166400)

摘要: **目的** 比较乳牙急性根尖周炎采用开放与封药治疗方法的临床效果。**方法** 选取我院收治的乳牙急性根尖周炎患者 82 例, 分为髓腔开放组和封药组, 每组 41 例, 其中髓腔开放组采用常规性开髓拔髓、冲洗根管清创, 再髓腔留棉球开放, 而髓腔封药组采用常规性开髓拔髓、冲洗根管清创后, 封甲醛甲酚, 观察两组患者的临床疗效。**结果** 髓腔开放组疼痛缓解与髓腔封药组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。髓腔封药组发生慢性牙周炎症明显少于髓腔开放组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 乳牙急性根尖周炎首诊治疗 2 种方法均能缓解牙齿疼痛, 但髓腔封药法能有效控制慢性牙周炎的症状。

关键词: 急性根尖周炎 乳牙 髓腔 首诊治疗

中图分类号: R788 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5187 (2016) 05-007-01

Abstract: **Objective** To compare the deciduous acute periapical and clinical effect of sealing an open drug treatments. **Methods** deciduous our hospital with acute periapical 82 patients were divided into groups and blocked the canal open drug groups of 41 cases in which the canal open group with regular open pulp pulpectomy, root canal irrigation clear Chong, cotton balls and then left open canal, the canal and seal the drug group with regular open pulp pulpectomy, root canal debridement flushing, sealing formocresol clinical efficacy were observed in patients. **Results** Medullary canal open group pain relief and seal the drug group, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). Canal closure chronic periodontal disease drug group was significantly less than the canal open group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** deciduous acute periapical first diagnosed two kinds of treatment methods can relieve tooth pain, but seal the canal drug method can effectively control symptoms of chronic periodontitis.

乳牙急性根尖周炎是目前儿童牙科的一种较常见的疾病, 一般情况下, 发生急性根尖周炎早期进行首诊处理, 会根据根尖渗出情况选择根管开放或封药的方法进行治疗^[1]。本次选取我院于 2015 年 1 月至 2016 年 4 月收治的乳牙急性根尖周炎患者 82 例, 观察不同方法治疗后疼痛及红肿消除的情况, 具体报道如下。

1 资料与方法

1.1 基本资料 选取我院于 2015 年 1 月至 2016 年 4 月收治的乳牙急性根尖周炎患者 82 例, 随机将患者分为髓腔开放组和髓腔封药组, 每组 41 例, 所有患者均为 5 岁以上儿童, 年龄 5 ~ 8 岁。入选标准: ①患牙龋坏严重, 邻牙、对颌牙龋坏情况不明显; ②采用 X 线片检测, 患牙根尖未出现低密度影像; ③患儿无过敏性疾病, 无全身性系统疾病; ④患儿家属对治疗过程已了解, 并签署知情同意书。

1.2 方法 髓腔开放组常规操作打开髓腔, 清除髓腔及根管内已感染坏死的组织, 降低其咬合, 在髓腔内放置棉球使其开放; 而髓腔封药组常规操作打开髓腔、拔髓, 清除髓腔及根管已感染坏死的组织, 降低其咬合, 如无渗出物渗出, 封甲醛甲酚药物, 如有渗出物渗出, 则用棉球内置髓腔中引流, 观察几分钟, 待渗出减少后再封甲醛甲酚。7 日后复诊。

1.3 诊断标准

1.3.1 疼痛缓解方面 两组患者治疗后 24h 内, 无明显疼痛或无需止痛药进行止痛, 则为疼痛缓解; 如疼痛加重, 周围组织的肿痛感加剧, 需进行局部处理, 如换药或开放引流。

1.3.2 牙齿肿痛方面 7 日后复查无牙龈红肿、牙齿松动、牙周肿胀等症状可判断为有效, 反之为无效。

1.4 统计分析 本组应用 SPSS19.0 的统计分析软件对数据进行分析。平均数之间的比较采用 t 检验, 两组之间的比较采用卡方 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为有差异性, 存在统计学意义^[2]。

2 结果

首诊治疗后, 髓腔开放组疼痛缓解 36 例, 疼痛未缓解 5 例; 而髓腔封药组疼痛缓解 34 例, 疼痛未缓解 7 例, 两组间差异无统计学

意义 ($P > 0.05$), 具体见表 1。7 日后复诊, 髓腔开放组有 12 例存在慢性牙周炎症, 而髓腔封药组只有 2 例, 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 具体见表 2。

表 1: 两组患者治疗后疼痛缓解情况 (n)

| 组别 | 例数 | 缓解 | 未缓解 |
|-------|----|----|--------|
| 髓腔开放组 | 41 | 36 | 5 |
| 髓腔封药组 | 41 | 34 | 7 |
| P 值 | | | > 0.05 |

表 2: 两组患者的牙周肿胀情况 (n, %)

| 组别 | 例数 | 有效 | 无效 | 有效率 % |
|-------|----|----|----|--------|
| 髓腔开放组 | 41 | 29 | 12 | 70.73 |
| 髓腔封药组 | 41 | 39 | 2 | 95.12 |
| P 值 | | | | < 0.05 |

3 讨论

乳牙龋齿病在早期其症状不明显, 往往不被重视。乳牙患龋后进展快, 易出现穿髓。因乳牙髓腔大, 根管粗, 炎症容易蔓延到牙根尖, 导致感染^[3], 因此乳牙急性根尖周炎很常见。临床处理方法是开放治疗, 减轻患儿疼痛, 缩短治疗时间。本文研究结果显示, 髓腔开放组与髓腔封药组在疼痛缓解方面, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。但髓腔封药组发生慢性牙周炎症明显少于髓腔开放组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

综上所述, 乳牙急性根尖周炎首诊治疗 2 种方法均能缓解牙齿疼痛, 但髓腔封药法能有效控制慢性牙周炎的症状。

参考文献

- [1] 王芳, 徐勤, 张英华, 等. 3 种根管消毒药物治疗乳牙根尖周炎的疗效分析 [J]. 实用口腔医学杂志, 2013, 29(1): 128-129.
- [2] 莫清波. 根尖周炎不同应急处理方法临床对比 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2013, 23(5): 352.
- [3] 张家胜. 替硝唑口腔贴片治疗牙周炎临床疗效分析 [J]. 实用药物与临床, 2012, 15(11): 767-768.

(接上页)

[6] Jang JY, Kim SJ, Cho EK, et al. TRAIL Enhances Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cells Sensitized by Hepatitis C Virus Infection: Therapeutic Implications [J]. PLoS One, 2014, 13(9): e98171.

[7] Korhonen R, Hömmö T, Keränen T, et al. Attenuation of TNF production and experimentally induced inflammation by PDE4

inhibitor rolipram is mediated by MAPK phosphatase-1 [J]. Br J Pharmacol, 2013, 169(7): 1525-1536.

[8] Pathak RK, Taj G, Pandey D, et al. Modeling of the MAPK machinery activation in response to various abiotic and biotic stresses in plants by a system biology approach [J]. Bioinformatics, 2013, 25(9): 443-449.