

p38 MAPK 信号通路在脓毒症大鼠海马区 神经元自噬中的作用*

周睿曦^{1,2}, 李熙鸿^{1,2△}, 屈艺^{1,2}, 李世平^{1,2}, 黄群^{1,2}

1. 四川大学华西第二医院 儿科(成都 610041); 2. 出生缺陷与相关妇女儿童疾病教育部重点实验室(四川大学)(成都 610041)

【摘要】目的 探讨 p38 丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路在脓毒症大鼠海马区神经元自噬中的作用。**方法** 通过盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)建立大鼠脓毒症模型。SD 大鼠随机分为假手术组(sham 组)、模型组(CLP 组)、溶媒组(CLP+Veh 组)、p38MAPK 抑制剂组(CLP+SB203580 组),每组分为 3、6、12、24 和 48 h 亚组;CLP+Veh 组和 CLP+SB203580 组分别侧脑室注射 1% DMSO 5 μ L 和 0.1 mmol/L SB203580 5 μ L,注射后 30 min 建立 CLP 模型,sham 组仅翻看盲肠后关腹,未做其他处理。监测大鼠生命体征,包括平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)和心率(heart rate, HR);神经行为学评分了解大鼠的脑损伤情况;大鼠脑海马区组织 HE 染色观察病理改变;透射电镜下观察大鼠脑海马区神经元自噬过程;Western blot 检测海马区微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3) II、LC3 I 选择性自噬接头蛋白(p62/sequestosome-1, p62/SQSTM1)、MAPK 激活蛋白激酶 2(MAPK-activated protein kinase 2, MK-2)、磷酸化 MK-2(phosphorylation MK-2, p-MK-2)的蛋白表达;免疫荧光染色观察大鼠海马区神经元 LC3 和 p62/SQSTM1 的表达。**结果** 在不同时间点,CLP 组大鼠 MAP 低于、HR 高于 sham 组,以造模后 12 h 变化最明显;CLP 组大鼠神经行为学评分最低,海马区组织病理改变明显,透射电镜下观察有较多自噬空泡形成。与 CLP 组比较,CLP+SB203580 组大鼠神经行为学评分回升,海马区病理改变好转,透射电镜下自噬空泡中的包裹物降解;Western blot 结果显示,与 sham 组比较,造模后 CLP 组大鼠海马组织 LC3 II / LC3 I 和 p-MK-2/MK-2 表达升高, p62/SQSTM1 表达下降,前者至 12 h 达到高峰,后者至 12 h 达到谷底,CLP+SB203580 组与其它组相比,在造模 12 h 时,大鼠海马组织 LC3 II /LC3 I 和 p-MK-2/MK-2 表达升高,而 p62/SQSTM1 表达进一步下降($P < 0.05$);免疫荧光法观察结果显示,海马区 LC3 和 p62/SQSTM1 在 NeuN 的定位及表达与 Western blot 所测得的结果一致。**结论** 脓毒症大鼠抑制 p38 MAPK 信号通路,可以使自噬进一步激活,对海马区神经元起到保护作用。

【关键词】 脓毒症 神经元 自噬 p38 MAPK 信号通路

Role of p38 Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathway in the Hippocampal Neurons Autophagy of Rats with Sepsis

ZHOU Rui-xi^{1,2}, LI Xi-hong^{1,2△}, QU Yi^{1,2}, LI Shi-ping^{1,2}, HUANG Qu^{1,2}. 1. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: hilixihong@126.com

【Abstract】Objective To investigate the role of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway in autophagy of neurons in hippocampus of sepsis rats. **Methods** A sepsis model was established by cecal ligation and puncture (CLP). SD rats were randomly divided into sham-operated group (sham group), model group (CLP group), vehicle-treated group (CLP+Veh group) and inhibitor-treated group (CLP+SB203580 group), and each group was divided into 3, 6, 12, 24 and 48 h subgroups. CLP+Veh group and CLP+SB203580 group were injected with 1% DMSO 5 μ L and 0.1 mmol/L SB203580 5 μ L respectively in the lateral ventricle, and CLP was established 30 min after injection. The sham group only turned over the cecum and closed the abdomen without other treatments. The vital signs of rats were monitored, including mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR). Neurobehavioral score was used to investigate the brain injury in rats. Histopathological changes in hippocampus of rats were observed by HE staining. The process of neuronal autophagy in hippocampal of rats was observed under transmission electron microscope (TEM). Western blot assay was performed to detect the expression of microtubule

* 四川省科技厅支撑项目(No. 2012SC0012)资助

△ 通信作者, E-mail: hilixihong@163.com

associated protein 1 light chain 3 (LC3) II, LC3 I, selective autophagy adaptor protein p62/sequestosome-1 (p62/SQSTM1), MAPK-activated protein kinase 2 (MK-2) and phosphorylation MK-2 (p-MK-2) in the hippocampus. The expressions of LC3 and p62/SQSTM1 in hippocampal neurons of rats were observed by immunofluorescence.

Results At different time points, MAP of CLP group was lower than sham group, while HR was higher than sham group, the change was most obvious at 12 h after molding; the neurobehavioral score of CLP group was the lowest; the histopathological changes in the hippocampus were obvious; and many autophagy vacuoles were observed under transmission electron microscope; compared with CLP group, the neurobehavioral score of CLP+SB203580 group increased; the pathological changes in the hippocampus improved; the inclusions in autophagy vacuoles were degraded under transmission electron microscopy; Western blot results showed; compared with sham group, expression of LC3 II /LC3 I, p-MK-2/MK-2 increased, and p62/SQSTM1 decreased in hippocampal tissue of CLP group in rat, the former reaches its peak at 12 h, the latter bottomed out at 12 h. Compared with the other groups, at 12 h of modeling, the expression of LC3 II /LC3 I, p-MK-2/MK-2 was further increased, the expression of p62/SQSTM1 decreased further in hippocampal tissue of CLP+SB203580 group in rat ($P<0.05$); immunofluorescence observation showed that localization and expression of LC3 and p62/SQSTM1 in NeuN were consistent with Western blot. **Conclusion** Inhibition of p38 MAPK signaling pathway in sepsis rats can further activate autophagy and protect neurons in the hippocampus.

【Key words】 Sepsis Neurons Autophagy p38 MAPK signaling pathway

脓毒症是一种临床常见的危重症疾病,常引起全身多器官功能障碍及衰竭,其中,超半数的脓毒症患者会出现不同程度的脑损伤,其主要临床表现是神经内分泌功能障碍和自主神经功能衰竭、谵妄、癫痫、昏迷甚至死亡^[1-2]。在大脑结构中,海马区对行为认知功能的调控意义重大,无论是脓毒症早期因短期记忆丧失和空间识别障碍引起的焦虑,还是长期认知障碍等症状,均与急性期海马区损伤密切相关^[3]。目前普遍认为脓毒症发生机制包括炎症^[4]、氧化应激^[5]、凋亡^[6-7]、自噬^[8]、线粒体功能障碍^[2]、脑微循环梗阻等^[9-10]。自噬激活障碍与脑组织受损密切相关^[8,11]。p38 丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK)信号通路是 MAPK 激酶家族主要成员之一,外界刺激可以通过使激酶中的 TGY 结构域磷酸化,触发应激调节蛋白激酶级联,最终激活 p38 MAPK 信号通路;目前有研究发现,p38 MAPK 信号通路对细胞自噬的调控意义重大,且在脓毒症大鼠中联合使用 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580,可明显降低死亡率^[12-14];为此,本研究通过盲肠结扎穿孔术 (cecal ligation and puncture, CLP)建立脓毒症模型,探讨 p38 MAPK 信号通路在脓毒症大鼠海马区神经元自噬中的作用。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

p38MAPK 抑制剂 SB203580 购于美国 Enzo 公司;蛋白酶抑制剂购于美国 Rcho 公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI)和蛋白定量试剂盒购于美国

Sigma 公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶制备试剂盒 (SDS-PAGE)购于美国 Biomiga 公司;聚偏二氟乙烯膜和免疫印迹发光底物 (ECL)显色液购于美国 Millipore 公司。免疫荧光和免疫印迹所用一抗购于美国 Abcam 公司;免疫荧光和免疫印迹所用二抗购于美国 Jackson ImmunoResearch 公司。光学显微镜和振荡切片机为德国 Leica 公司产品;激光共聚焦扫描显微镜和 FV10-ASW-4.2 软件为日本 Olympus 公司产品;H-600IV 投射电子显微镜为日本 Hitachi 公司产品;GDS8000 凝胶成像分析系统购于美国 Bio-Rad 公司;26G 微量注射器购于美国 Hamilton 公司。

1.2 动物分组

30 日龄雄性 SD 大鼠 (100±10) g 购于四川达硕动物科技有限公司,经四川大学动物保护研究委员会批准,按照相应的指南和规则进行动物实验。将 SD 大鼠随机分为假手术组 (sham 组, $n=30$ 只)、模型组 (CLP 组, $n=30$ 只)、溶媒组 (CLP+Veh 组, $n=30$ 只)、抑制剂组 (CLP+SB203580 组, $n=30$ 只);每组随机分为 3、6、12、24 和 48 h 亚组,每亚组 6 只。在避强光、避噪音, 22~25 °C, 55%~58% 相对湿度的环境下自由进食和饮水。

1.3 药物处理及建立脓毒症大鼠模型

大鼠腹腔注射 100 g/L 水合氯醛 (0.4 mL/100 g)麻醉后,消毒头部皮肤并切开,置于立体定位仪上,于前囟向后 0.8 mm,中线旁 1.5 mm 处用牙科钻钻开颅骨,挑开硬脑膜,CLP+SB203580 组用 26G 微量注射器向侧脑室注射事先溶于 1% DMSO

配置成浓度为 0.1 mmol/L SB203580 5 μL ^[15],以 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度缓慢注射,注射完毕后停留 2 min 再缓慢退针,缝合伤口;CLP+Veh 组使用同样的方法侧脑室注射 1%DMSO 5 μL 。完成注射后 30 min 进行脓毒症大鼠模型建立。CLP 组、CLP+Veh 组及 CLP+SB203580 组采用 CLP 建立模型^[16];sham 组打开腹腔仅翻看盲肠后还纳,不做结扎穿孔,余操作不变。

1.4 大鼠生命体征监测及神经行为学评分

脓毒症大鼠模型建立后,腹腔注射 100 g/L 水合氯醛(0.4 mL/100 g)麻醉大鼠,于股动脉置管后连接 iWorx 生物信号记录仪,用于连续监测平均动脉压(MAP)和心率(HR)。

在不同时间点观察大鼠的精神及活动状态、切口愈合及有无感染等一般情况,并对大鼠进行神经行为学评分,包括耳廓反射、角膜反射、翻正反射、甩尾反射和逃逸反射。耳廓反射是轻触耳廓,观察是否引起激烈的头部晃动;角膜反射是用棉签轻触角膜,观察是否引起头部运动以逃避棉签;甩尾反射是轻拍尾巴,观察是否引起身体收缩试图收回尾巴;翻正反射是将其反向放置于桌面,观察恢复正常体位的反应过程;逃逸反射是观察大鼠远离有害刺激的自主活动。无反射为 0 分,反射减弱为 1 分(10 min 内),正常反射为 2 分;最高得分为 10 分。得分越低,脑损伤越严重^[6]。

1.5 大鼠脑组织 HE 染色

在相应时间点对大鼠腹腔注射 100 g/L 水合氯醛(0.4 mL/100 g)麻醉后,心脏灌注磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)200 mL、体积分数为 4%多聚甲醛 200 mL。采集脑组织并固定于体积分数为 4%多聚甲醛中 24~48 h,石蜡包埋、脑组织切成 5 μm 薄片,苏木精和伊红染色,中性树脂胶封片,用光学显微镜观察病理改变。

1.6 电子显微镜观察神经元自噬的超微结构

在大鼠脑组织冠状面,切取视神经交叉后约米粒大小海马区样本,将其固定于 25 g/L 戊二醛溶液中 24~36 h,随后 PBS 冲洗,固定于含 30 g/L 戊二醛及 10 g/L 磷酸盐缓冲四氧化锇溶液中 2 h,环氧树脂包埋,将脑组织切成 0.12 μm 薄片,用 2 g/L 柠檬酸铅及 10 g/L 醋酸双氧铀染色,透射电子显微镜下观察神经元自噬的超微结构。

1.7 Western blot 检测自噬相关信号通路蛋白的表达

冰上分离出各组大鼠海马组织,将其部分保存

在细胞裂解液(50 mmol/L Tris HCl, 150 mmol/L NaCl, 10 mg/L NP-40, 蛋白酶抑制剂)中。样品于 4 $^{\circ}\text{C}$ 匀浆,并在 12 000 $\times g$ 下离心 30 min,取上清液于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 BAC 法对样品进行蛋白定量分析,保证蛋白含量一致。制备不同浓度的 SDS-PAGE 凝胶电泳,分离出目标蛋白并转移到聚偏二氟乙烯膜上,用 TBST 将膜漂洗 3 次,用含有一抗的脱脂牛奶于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,一抗包括:兔抗微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3)多克隆抗体(1:1 000),鼠抗选择性自噬接头蛋白(p62/sequestosome-1, p62/SQSTM1)单克隆抗体(1:1 000),兔抗 MAPK 激活蛋白激酶 2(MAPK-activated protein kinase 2, MK-2)多克隆抗体(1:1 000),兔抗磷酸化 MK-2(p-MK-2)多克隆抗体(1:1 000),鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体(1:5 000)。用 TBST 将膜漂洗 3 次,将其放入湿盒中用含有二抗的脱脂牛奶避光孵育 2 h,二抗是由 HRP 标记的抗兔或抗鼠 IgG 抗体(1:5 000)。取出膜并滴加底物显色液,室温反应 1 min 后放入暗盒,通过凝胶成像分析系统进行扫描,并使用 Gel-Pro 图像分析定量软件分析出 LC3 I、LC3 II、p62/SQSTM1、p-MK-2、MK-2 与内参 GAPDH 灰度值的比值为其目的蛋白的相对表达量。

1.8 免疫荧光染色检测 LC3、p62/SQSTM1 在神经元中的分布和表达

将取出的另一部分海马组织固定于体积分数为 4%多聚甲醛 24~48 h,用 25 g/L 琼脂糖包埋,凝固后使用振荡切片机将其切成 40 μm 薄片。PBS 漂洗 3 次,分别使用 3 g/L Triton X-100 作用 30 min 和含 20 g/L 胎牛血清的封闭液作用 1 h,然后加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,一抗包括:兔抗 LC3 多克隆抗体(1:500),鼠抗 p62/SQSTM1 单克隆抗体(1:500),鼠抗神经元特异核蛋白(neuron specific nucleoprotein, NeuN)单克隆抗体(1:500),兔抗 NeuN 单克隆抗体(1:400)。PBS 漂洗 3 次后,加入稀释二抗的封闭液,室温下避光孵育 2 h,二抗包括:CY3 标记驴抗兔 IgG 和 Alexa Fluor488 标记驴抗鼠 IgG。再用 PBS 洗涤 3 次,用 DAPI 在室温下避光染核 10 min。随后用抗荧光淬灭剂封片,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。通过激光共聚焦扫描显微镜和 FV10-ASW-4.2 软件获取图片,分析其分布特点和信号强弱。

1.9 统计学方法

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 t 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠生命体征监测及神经行为学评分

在不同时间点, CLP 组大鼠 MAP 均低于 sham 组, 造模后 12 h 最低, CLP+SB203580 组大鼠 MAP

均高于 CLP 组(图 1A, $P < 0.05$); CLP 组大鼠 HR 均高于 sham 组, 在 12 h 及 24 h 最高, CLP+SB203580 组大鼠 HR 均低于 CLP 组(图 1B, $P < 0.05$); CLP 组大鼠神经行为学评分均低于 sham 组, 在 12 h 最低, CLP+SB203580 组大鼠神经行为学评分均高于 CLP 组(图 1C, $P < 0.05$)。因此, 后续实验选择造模 12 h 时(上述指标变化最明显)进行组织细胞形态学、神经元自噬等定性指标的观察。

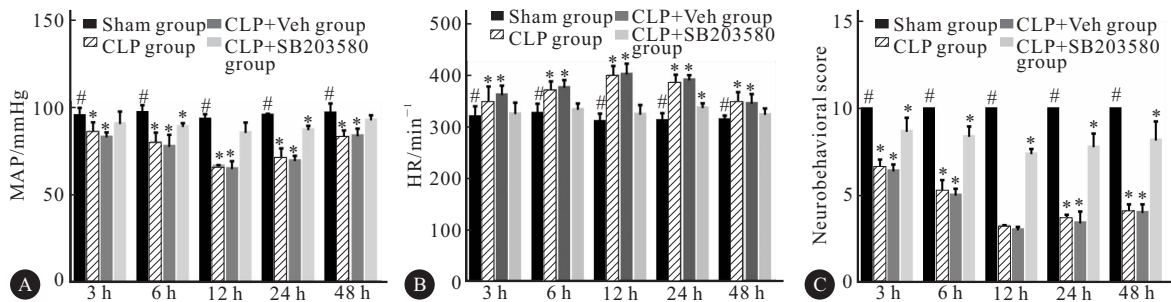


图 1 各组大鼠不同时间生命体征(A: MAP, B: HR)和神经行为学评分(C)比较($n=6$)

Fig 1 Comparison of vital signs (A: MAP; B: HR) and neurobehavioral scores (C) at different time in each group ($n=6$)

MAP: Mean arterial pressure; HR: Heart rate. * $P < 0.05$, vs. sham group in same time point; # $P < 0.05$, vs. CLP+SB203580 group in same time point

2.2 大鼠海马区组织病理学变化

Sham 组大鼠各时间点海马区组织未见明显改变, 细胞排列有序, 结构规整。造模 12 h 时, CLP 组及 CLP+Veh 组大鼠海马区细胞核固缩, 胞浆着色

浅, 尼氏体消失, 细胞数目减少, 排列紊乱, 表现为急性创伤性改变。经 SB203580 处理后 CLP 大鼠海马区细胞水肿有所缓解, 结构更具组织性, 见图 2。

2.3 海马区神经元自噬情况观察

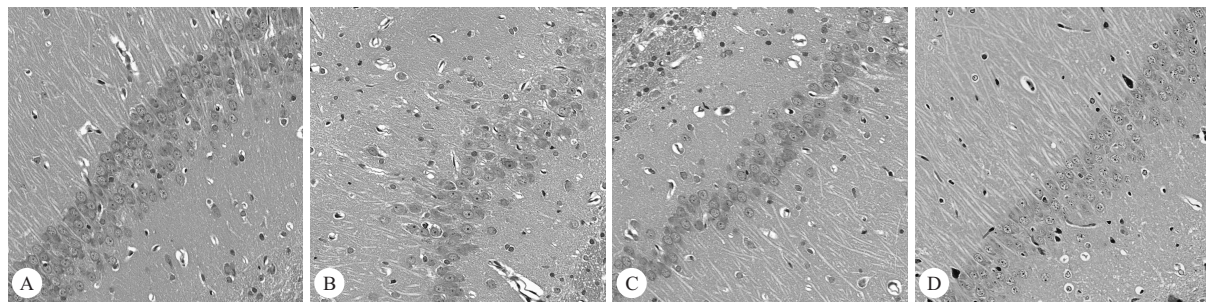


图 2 HE 染色观察各组海马区在 12 h 的病理改变。×400

Fig 2 Pathological changes in the hippocampus of each group at 12 h were observed by HE staining. ×400

A: Sham group; B: CLP group; C: CLP+Veh group; D: CLP+SB203580 group

如图 3 所示, 造模 12 h 时, sham 组海马区神经元中未见自噬体, 细胞器分布均匀, 内质网、线粒体和高尔基体等细胞器外观正常。CLP 组和 CLP+Veh 组海马区神经元出现自噬空泡, 其中包裹破损细胞器和蛋白质(图 B、图 C, 箭头); 线粒体肿胀趋近于球形, 腔隙扩张, 内部结构紊乱; 内质网及高尔基体肿胀、破损。经 SB203580 处理后, 海马区神经

元中出现多个体积较小的自噬小泡, 其中包含有已降解的细胞器碎片(图 D, 箭头), 各细胞器分布及结构稍有异常。

2.4 各组大鼠自噬相关信号通路蛋白在海马组织的表达

Western blot 结果显示: 大鼠海马组织 LC3 II / LC3 I 和 p-MK-2 / MK-2 的表达在 sham 组最低,

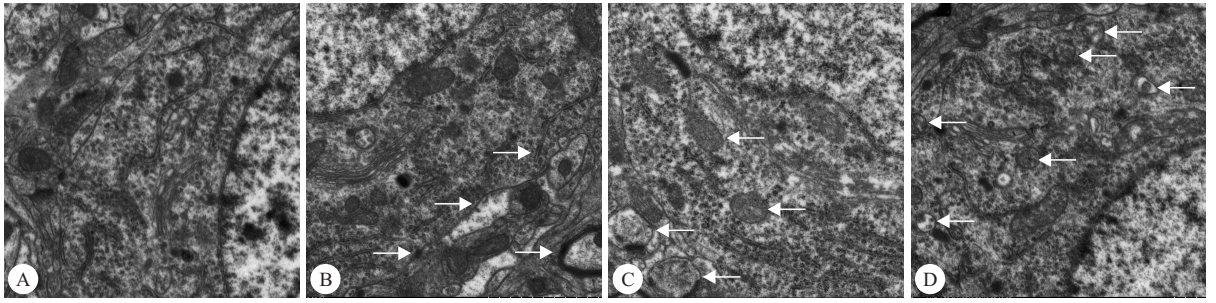


图 3 透射电镜下观察各组海马区神经细胞在 12 h 的自噬过程。× 10 000

Fig 3 The autophagy of the hippocampal neurons in each group was observed at 12 h under transmission electron microscopy. × 10 000

A; Sham group; B; CLP group; C; CLP+Veh group; D; CLP+SB203580 group; Arrows; Encases damaged organelles and proteins in fig B and fig C; Autophagy vesicles, contains degraded organelle fragments in fig D

CLP 组在造模后逐渐升高, 至 12 h 达到高峰, 随后 24 h 和 48 h 稍有下降 ($P < 0.05$, 图 4a); p62/SQSTM1 的表达趋势与 LC3 II/LC3 I 相反, sham

组表达最高, CLP 在造模后逐渐下降, 在 12 h 达到谷底, 24 h 和 48 h 稍有回升 ($P < 0.05$, 图 4a)。在造模 12 h 时, CLP + SB203580 组与前 3 组相比,

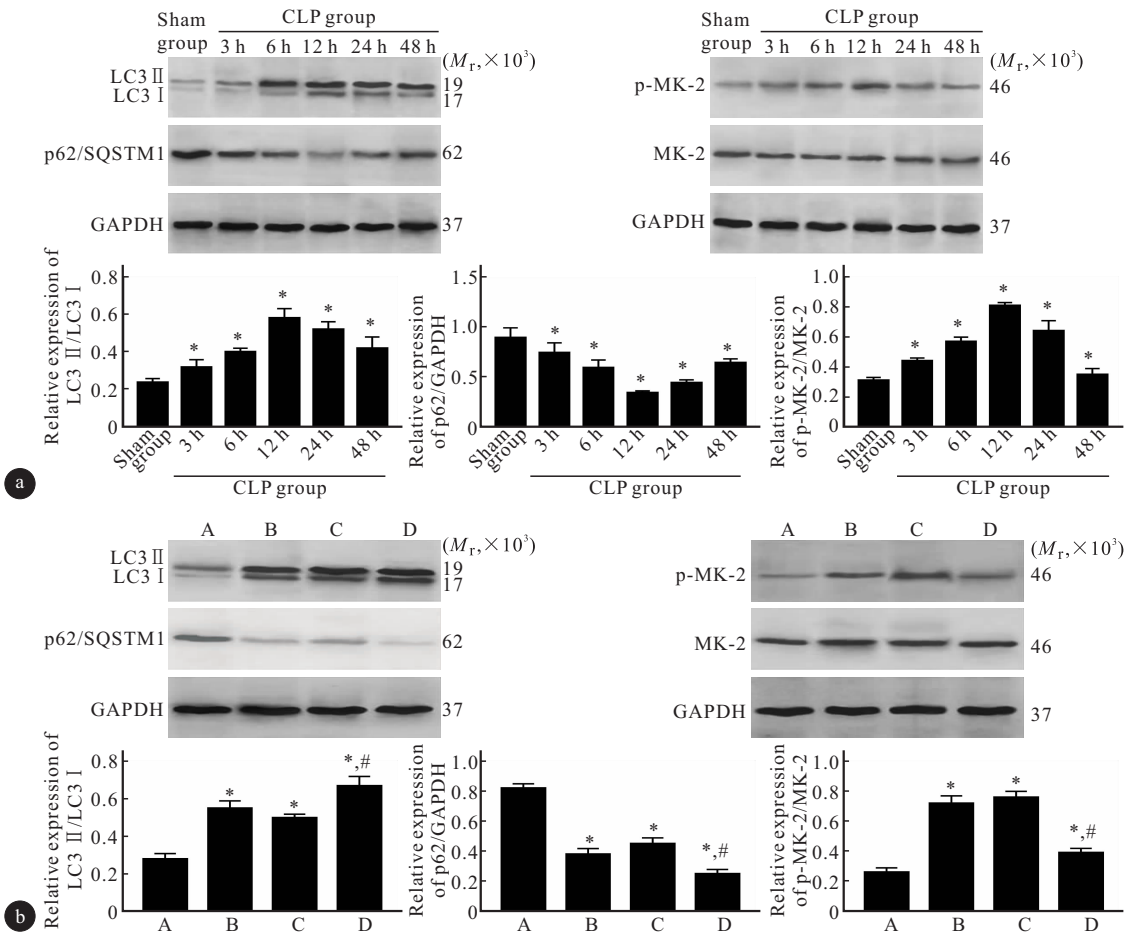


图 4 Western blot 分析各组大鼠海马区自噬相关蛋白的表达 ($n=6$)

Fig 4 The relative expression of hippocampal autophagy related proteins in each group was analyzed by western blot analysis ($n=6$)

a: Expression of autophagy related proteins in CLP group at different time; b: Expression of autophagy related proteins in each group 12 h after surgery; A: Sham group; B: CLP group; C: CLP+Veh group; D: CLP+SB203580 group; * $P < 0.05$, vs. sham group; # $P < 0.05$, vs. CLP group and CLP+Veh group

LC3 II /LC3 I 进一步升高,而 p62/SQSTM1 进一步下降($P < 0.05$, 图 4b), p-MK-2/MK-2 的表达较 CLP 组和 CLP + Veh 组有所下降($P < 0.05$, 图 4b)。

2.5 海马区 LC3 和 p62/SQSTM1 的定位及表达

不同时间点的 sham 组大鼠海马区 LC3 荧光信号均在 NeuN 中散在分布,造模 12 h 时,CLP 组大

鼠海马区 LC3 荧光信号最强,并可见聚集性分布(图 5);而 p62/SQSTM1 荧光信号在 sham 组最强,主要在 Neu N 胞浆中表达,在 12 h 荧光信号表达最低,与 CLP 组和 CLP + Veh 组相比,CLP + SB203580 组海马区 LC3 荧光信号增强,在神经元中聚集性分布区域增多,p62/SQSTM1 荧光信号最弱。LC3 和 p62/SQSTM1 在 NeuN 的分布和表达

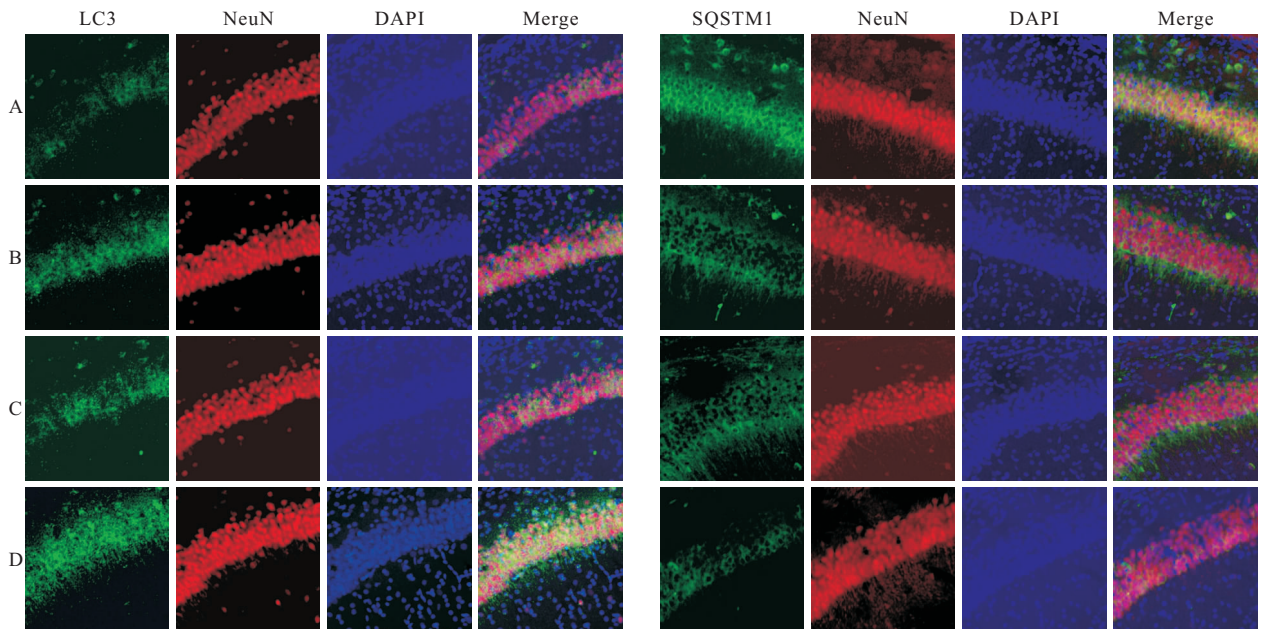


图 5 LC3 和 p62/SQSTM1 在各组大鼠(造模 12 h)海马区神经细胞中的表达及定位。×400

Fig 5 Expression and localization of LC3 and p62/SQSTM1 in neurons in the hippocampus of rats in each group (12 h). ×400

A: Sham group; B:CLP group; C:CLP+ Veh group; D: CLP+SB203580 group. Three-color staining for anti-LC3 antibody or anti-p62/SQSTM1 antibody (green), NeuN (red), and DAPI (blue)

与 Western blot 所测得的结果一致。

3 讨论

在本研究中,我们通过 CLP 建立脓毒症大鼠模型,与 sham 组相比,CLP 组各时间点大鼠 MAP 降低,HR 增高,一般情况差,神经行为学评分低下,脑组织出现明显病理改变,说明脓毒症大鼠模型建立成功。同时,发现脓毒症大鼠海马区有自噬现象发生,在 12 h 达到高峰,在这一时间点脓毒症大鼠脑组织病理损伤最为严重,神经行为最为异常。然而,通过 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 可以进一步激活自噬过程,同时减轻大鼠脑组织病理损伤,神经行为好转;说明脓毒症发生时 p38 MAPK 信号通路的激活可能与自噬过程密切相关,如果抑制 p38 MAPK 信号通路可以使自噬过程进一步激活,同时减轻脑组织病理损伤,起到保护作用。

自噬是在亚细胞水平通过降解的细胞器及错误

折叠的蛋白质,调节机体的细胞分化、组织重构、生长发育等,使机体在感染、癌症、衰老、神经退行性疾病等发生时维持内环境稳态^[17],是应对营养缺乏^[18]、细胞凋亡^[19]、炎症反应^[20]及氧化应激^[21]等刺激的适应性代谢过程。自噬激活后,胞浆开始出现双膜结构的自噬囊泡,随后其外膜与溶酶体膜结合,内膜将包裹的物质带入溶酶体腔内形成自噬溶酶体,最后被一系列水解酶降解完成整个自噬过程。然而,过度自噬会引起自噬性细胞死亡,即 II 型程序性细胞死亡,破坏细胞正常结构,引起细胞坏死^[22]。

目前研究发现,在脓毒症发生过程中心、肝、肺和肾等处均有自噬现象出现,脑组织皮质和海马区也有自噬现象发生^[8,23-27]。KABEYA 等^[28-29]研究发现,在哺乳动物体内 LC3 与自噬体密切相关,自噬发生时,胞浆中的 LC3 I 转化为 LC3 II,LC3 II 可以通过磷脂酰乙醇胺与自噬体膜紧密结合,是自噬体的标记蛋白;而 p62/SQSTM1 通过选择性结

合自噬体成分 LC3 形成多泛素化蛋白聚合物,对自噬过程起负反馈调节作用^[30]。本研究发现:CLP 组 MAP 降低,HR 升高,神经行为学评分下降,海马区组织病理改变加重;与 sham 组相比,CLP 组中 LC3 荧光信号增强,而 p62/SQSTM1 荧光信号减弱,Western blot 分析同样发现,与 sham 组相比,在 CLP 组中 LC3 II/LC3 I 蛋白表达相对增高,p62/SQSTM1 蛋白表达相对降低,由此我们得知自噬被激活;但是,通过透射电镜可以观察到 CLP 组大鼠海马区神经元中出现了较多包裹着破碎细胞器或蛋白质的大型自噬小体,但是并未出现包裹物质降解后形成的自噬小泡,说明该自噬过程仅包裹破损物质,并没有对物质进行降解,自噬没有完全激活;即脓毒症发生时,海马区神经元中有自噬现象出现,但自噬过程没有完全激活,因此,我们认为自噬的不完全激活可能与脑组织损伤有关。

自噬的调节主要受到磷脂酰肌醇 3 激酶和 mTOR 信号通路的调节^[31],但脓毒症早期即可出现严重的炎症反应,氧化应激和细胞凋亡均与自噬过程密切相关,相互调节相互制衡;目前已有研究发现,在不同的疾病模型和体外细胞研究中 p38 MAPK 信号通路可以调节炎症反应^[32],氧化应激^[33],细胞凋亡^[34]和自噬^[13],并且 p38 MAPK 信号通路可以不用依赖 mTOR 途径,独立调节自噬;但脓毒症时海马区神经元的自噬现象是否受 p38 MAPK 信号通路的调节尚未可知。

为了研究脓毒症时 p38 MAPK 信号通路对海马区神经元自噬的作用,本研究使用 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 对 CLP 诱导脓毒症大鼠进行预处理,由于 SB203580 的使用不会干扰 p38 磷酸化,而是阻断下游激酶的活性,因此,我们通过检测 p38 通路下游介质 P-MK-2 的蛋白表达来评估 p38 MAPK 的激活^[35]。本实验发现:通过透射电镜可以观察到 CLP+SB203580 组海马区神经元出现了多个包裹物质降解后,仅包涵细胞器碎片的自噬小泡;与 CLP 组和 CLP + Veh 组相比,CLP + SB203580 组海马区病理改变好转,且 MAP 回升,HR 下降,神经行为学评分升高;免疫荧光显示 CLP+SB203580 组 LC3 荧光信号进一步增强,p62/SQSTM1 荧光信号进一步减弱;免疫印迹法可见 CLP+SB203580 组中 LC3 I 进一步向 LC3 II 转化,即 LC3 II/LC3 I 进一步增高,p62/SQSTM1 则进一步下降。因此,我们认为抑制 p38 MAPK 信号通路可以使脓毒症发生时海马区的自噬激活更加完

全,将自噬体吞噬的细胞器进一步降解,减轻海马区组织病理改变,从而保护脑组织。

综上所述,脓毒症发生时海马区神经元有自噬现象发生,但由于自噬的不完全激活,自噬体仅包裹破损细胞器而不能对其进行充分降解,这可能是导致脓毒症发生时海马区损伤的原因之一;我们进一步使用 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 处理后,海马区神经元自噬进一步激活,受损的细胞器得以降解,且组织病理改变好转及神经行为学评分提高,说明脓毒症发生时,抑制 p38 MAPK 信号通路可以调节自噬过程,改善海马区神经元损害。通过我们的研究,进一步厘清了脓毒症发生时海马区神经元自噬的全过程,及相关的信号通路。因此,我们可以考虑在临床上使用抑制 p38 MAPK 信号通路的相关药物,对脓毒症患者进行早期预防治疗,减轻其脑组织损伤,改善预后。

参 考 文 献

- [1] ZHANG LN, WANG XT, AI YH, *et al.* Epidemiological features and risk factors of sepsis-associated encephalopathy in intensive care unit patients: 2008-2011. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(5): 828-831.
- [2] SIAMI S, POLITO A, SHARSHAR T. Sepsis-associated encephalopathy. *Transl Med*, 2012, 2(33): 20-27.
- [3] ANNANE D. Hippocampus: a future target for sepsis treatment! *Intens Care Med*, 2009, 35(4): 585-586.
- [4] JACOB A, BRORSON JR, ALEXANDER JJ. Septic encephalopathy: inflammation in man and mouse. *Neurochem Int*, 2011, 58(4): 472-476.
- [5] COMIM CM, CASSOLJR OJ, CONSTANTINO LS, *et al.* Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochem Res*, 2011, 36(2): 304-311.
- [6] KAFA IM, UYSAL M. Sepsis induces apoptotic cell death in different regions of the brain in a rat model of sepsis. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2010, 70(3): 246-260.
- [7] SEMMLER A, OKULLA T, SASTRE M, *et al.* Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *J Chem Neuroanat*, 2005, 30(2): 144-157.
- [8] SU Y, QU Y, ZHAO F, *et al.* Regulation of autophagy by the nuclear factor κ B signaling pathway in the hippocampus of rats with sepsis. *J Neuroinflamm*, 2015, 12(1): 1-12.
- [9] SCHRAMM P, KLEIN KU, FALKENBERG L, *et al.* Impaired cerebrovascular autoregulation in patients with severe sepsis and sepsis-associated delirium. *Crit Care Med*, 2012, 16(5): 1-8.
- [10] BACKER DD, DONADELLO K, SAKR Y, *et al.* Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis:

- impact of time of assessment and relationship with outcome. *Crit Care Med*,2013,41(3):791-799.
- [11] PIETROCOLA F, IZZO V, NISO-SANTANO M, *et al.* Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Semin Cancer Biol*,2013,23(5):310-322.
- [12] OBATA T, BROWN GE, YAFFE MB. MAP kinase pathways activated by stress; the p38 MAPK pathway. *Crit Care Med*,2000,28(4 Suppl):N67-N77.
- [13] SUI X, KONG N, YE L, *et al.* p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett*,2014,344(2):174-179.
- [14] O'SULLIVAN AW, WANG JH, REDMOND HP. NF-kappaB and p38 MAPK inhibition improve survival in endotoxin shock and in a cecal ligation and puncture model of sepsis in combination with antibiotic therapy. *J Surg Res*, 2009,152(1):46-53.
- [15] KIM SW, YU YM, PIAO CS, *et al.* Inhibition of delayed induction of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates kainic acid-induced neuronal loss in the hippocampus. *Brain Res*,2004,1007(1/2):188-191.
- [16] RITTIRSCH D, HUBERLANG MS, FLIERL MA, *et al.* Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*,2009,4(1):31-36.
- [17] LEVINE B, KROEMER G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*,2008,132(1):27-42.
- [18] SAKATA T, SAITO A, SUGIMOTO H. *In situ* measurement of autophagy under nutrient starvation based on interfacial pH sensing. *Sci Rep*,2018, 8(1): 8282[2018-09-16]. <https://www.nature.com/articles/s41598-018-26719-4>. doi: 10.1038/s41598-018-26719-4.
- [19] POTT J, KABAT AM, MALOY KJ. Intestinal epithelial cell autophagy is required to protect against TNF-induced apoptosis during chronic colitis in mice. *Cell Host Microbe*, 2018,23(2):191-202.
- [20] DERETIC V, KLIONSKY DJ. Autophagy and inflammation: a special review issue. *Autophagy*,2018, 14(2):1-4.
- [21] MIZUNOE Y, WATANABE S, SUDO Y, *et al.* Trehalose protects against oxidative stress by regulating the Keap1-Nrf2 and autophagy pathways. *Redox Bio*, 2018, 15: 115-124 [2018-09-16]. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.007>.
- [22] GALLUZZI L, VITALE I, ABRAMS JM, *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines; recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differ*,2012,19(19):107-120.
- [23] HSIEH CH, PAI PY, HSUEH HW, *et al.* Complete induction of autophagy is essential for cardioprotection in sepsis. *Ann Surg*,2011,253(6):1190-1200.
- [24] LIN CW, LO S, PERNG DS, *et al.* Complete activation of autophagic process attenuates liver injury and improves survival in septic mice. *Shock*,2014,41(3):241-249.
- [25] LO S, YUAN SF, HSU C, *et al.* Lc3 over-expression improves survival and attenuates lung injury through increasing autophagosomal clearance in septic mice. *Ann Surg*,2013,257(2):352-363.
- [26] HOWELL GM, GOMEZ H, COLLAGE RD, *et al.* Augmenting autophagy to treat acute kidney injury during endotoxemia in mice. *PLoS One*,2013,8(7):e69520[2018-09-16]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069520>.
- [27] 黄群, 陈斌, 李雅斐, 等. 免疫相关 GTP 酶 M1 在脓毒症诱导脑损伤小鼠皮质神经元细胞自噬中的作用. *中南大学学报(医学版)*,2017,42(12):1353-1360.
- [28] KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J*,2000, 19(21):5720-5728.
- [29] KABEYA Y, MIZUSHIMA N, YAMAMOTO A, *et al.* LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*,2004, 117(13):2805-2812.
- [30] BJØRKØY G, LAMARK T, BRECH A, *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*,2005,171(4):603-614.
- [31] MEIJER AJ, CODOGNO P. Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol Aspects Med*, 2006,27(5):411-425.
- [32] ZHAO L, LIU X, LIANG J, *et al.* Phosphorylation of p38 MAPK mediates hypoxic preconditioning-induced neuroprotection against cerebral ischemic injury via mitochondria translocation of Bcl-xL in mice. *Brain Res*, 2013,1503(1):78-88.
- [33] MA JQ, DING J, ZHANG L, *et al.* Ursolic acid protects mouse liver against CCl4-induced oxidative stress and inflammation by the MAPK/NF-κB pathway. *Environ Toxicol Pharmacol*,2014,37(3):975-983.
- [34] LIU Y, WANG N, ZHANG S, *et al.* Autophagy protects bone marrow mesenchymal stem cells from palmitate-induced apoptosis through the ROS/JNK/p38 MAPK signaling pathways. *Mol Med Rep*,2018,18(2):1485-1494.
- [35] WANG Y, LI XL, AN GL, *et al.* SB203580 inhibits epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis in a rat silicosis model. *Toxicol Lett*,2016, 259:28-34[2018-09-16]. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.591>.

(2018-12-22 收稿, 2019-04-24 修回)

编辑 沈进