网络出版时间:2021-7-28 13:05 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1031.046.html

抑制 p38MAPK 信号通路对尿源性脓毒血症兔肾组织细胞凋亡的影响及其作用机制

唐亚纯[1],许武军[2],陈 仙[2],吴孝斌[2],符 浩[1]

摘要 **目的** 探讨抑制 p38MAPK 信号通路对尿源性脓毒血症兔肾组织细胞凋亡的影响及其作用机制。**方法** 将 60 只新西兰兔按随机数字表法分为 4 组:假手术组(sham)、模型组(Model)、p38MAPK 抑制剂 SB203580 组(SB203580)、SB203580+p53 激活剂 Nutlin-3 组(SB203580+Nutlin-3),每组 15 只。采用输尿管近端注入大肠埃希菌菌液法制作尿源性脓毒血症模型,术前 30 min 静脉注射 30 μg/kg SB203580 或腹腔注射 128 mg/kg Nutlin-3 进行干预,1 次/d,共 3 d。记录术后 24、48、72 h 时各组兔肛温、呼吸频率和心率;全自动分析仪检测白细胞计数以及血清肌酐、尿素氮含量;ELISA 检测血清白细胞介素 1β(IL-1β)、白细胞介素 6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α(TNF-α)含量;TUNEL 染色观察肾组织细胞凋亡情况;qRT-PCR 法检测肾组织 MDM2 和 p53 mRNA 表达水平;Western blot 法检测肾组织 Cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2、p-p38MAPK、MDM2、p53 和 PUMA 等蛋白表达水平。**结果** 与 Model 组比较,SB203580 组兔肛温、呼吸频率、心率、白细胞计数、血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平以及血清肌酐和尿素氮含量降低($P<0.05$),同时肾组织细胞凋亡率、p53 mRNA 以及 p53、Cleaved caspase-3、Bax、PUMA、p-p38MAPK 等蛋白水平降低($P<0.05$),而 MDM2 mRNA 以及 MDM2、Bcl-2 等蛋白水平增加($P<0.05$)。与 SB203580 组比较,SB203580+Nutlin-3 组兔肛温、呼吸频率、心率、白细胞计数、血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平以及血清肌酐和尿素氮含量升高($P<0.05$),同时肾组织细胞凋亡率、p53 mRNA 以及 p53、Cleaved caspase-3、Bax、PUMA 等蛋白水平增加($P<0.05$),Bcl-2 蛋白水平降低($P<0.05$),而 MDM2 mRNA 以及 MDM2、p-p38MAPK 等蛋白水平无显著变化($P>0.05$)。**结论** 抑制 p38 MAPK 信号通路通过促进 MDM2 表达而抑制 p53 介导的细胞凋亡途径,从而减少尿源性脓毒血症兔肾组织细胞凋亡。

关键词 p38MAPK 信号通路;尿源性脓毒血症;p53;细胞凋亡

中图分类号 R 459.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)09-1417-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.09.014

2021-03-06 接收

基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(编号:19C1561);湖南省卫生健康委科研计划课题项目(编号:B2019112);衡阳市科技局指导性项目(编号:S2018F9031C25333)

作者单位:[1] 南华大学附属南华医院泌尿外科,衡阳 421002

[2] 南华大学附属第二医院泌尿外科,衡阳 421001

作者简介:唐亚纯,男,副主任医师;

许武军,男,副主任医师,责任作者,E-mail:xkye908@163.com

脓毒症是一种常见的由感染引起的全身炎症反

The hUC-MSCs were transfected with AhR-homo-1432 inhibitor and AhR-homo-1432 inhibitor negative control, and set as si-NC group and si-AhR group. The proliferation ability of hUC-MSCs were measured by CCK-8 assay on day 1, 3, 5 and 7 after transfection. Real-time quantitative PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of chondrogenic marker SOX-9 and COL2A1 after 7 days of the chondrogenic differentiation. Alcian blue staining was used to detect the expression of proteoglycan. ***Results*** Compared with si-NC group, the mRNA and protein expression of AhR in si-AhR group decreased which indicated the transfection of hUC-MSCs was successful. The results of CCK-8 showed that compared with si-NC group, the cell viability of si-AhR group improved on 5 and 7 day. After induction of chondrogenic differentiation, the results showed that compared with si-NC group, the expression of SOX-9 and COL2A1 in si-AhR group increased and Alcian blue staining showed that the si-AhR group had more proteoglycan contents, deeper staining and stronger cartilage differentiation ability. ***Conclusion*** Knocking down the expression of AhR can promote the proliferation and chondrogenic differentiation of hUC-MSCs

Key words human umbilical cord mesenchymal stem cells; aryl hydrocarbon receptor; cell proliferation; chondrogenesis

应综合征,可导致机体重大脏器功能障碍。在多种感染途径中,尿路感染约占严重脓毒症病例的9%[1],常见于与临床医疗相关的尿路感染,包括因尿路干预和前列腺活检导致的尿源性脓毒症[2]。研究[3]发现,上尿路感染的患者发生患肾功能衰竭的风险更高。肾组织细胞凋亡是尿源性脓毒症的病理生理学的核心表现,因此抑制肾细胞凋亡对保护尿源性脓毒症患者肾功能尤为重要。p38 丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)是一种应激激活蛋白激酶,对细胞存活和增殖具有负性调节作用[4]。前期研究[5]显示,H_2S 能够通过抑制肾组织中 p38 MAPK 蛋白的磷酸化激活而减少尿源性脓毒血症兔肾组织细胞凋亡,但 p38 MAPK 信号通路的抑制又是如何介导尿源性脓毒血症兔肾组织细胞凋亡目前还未知。作为抑癌基因,p53 可通过参与诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期进程等生物学过程发挥作用。有研究[6]显示,p38 MAPK 能够通过介导小鼠双微体扩增(murine double minute 2,MDM2)蛋白降解而促进 p53 表达,而 p53 介导的细胞凋亡途径是细胞凋亡的重要途径之一。因此,该研究通过观察 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 对尿源性脓毒症新西兰兔肾功能以及肾组织凋亡情况的影响,探讨 p38 MAPK 介导肾细胞凋亡的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 60 只健康雄性新西兰兔购自湖南太平生物科技有限公司,体质量 2.0 ~ 2.4 kg,实验动物生产许可证:SCXK(湘)2015 - 0004。标准颗粒饲料及纯净水喂养,铁笼边放饲料槽及自由饮水管,湿度 50% ~ 60%,室温 20 ~ 25 ℃。

1.2 主要试剂与仪器 大肠埃希菌菌液购自美国 ATCC(25922),由南华大学附属第二医院检验科保存。p53 激活剂 Nutlin-3 购自美国 Selleckem 公司;p38 MAPK 抑制剂 SB203580 购于美国 MedChemExpress 公司;血清白细胞介素 1β(interleukin-1β,IL-1β)、白细胞介素 6(interleukin-6,IL-6)和肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)含量检测 ELISA 试剂盒购自南京森贝伽生物科技公司;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(绿色 FITC 标记荧光)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;PrimeScript RT 试剂盒和 TB Green® Premix Ex Taq™ Ⅱ试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;鼠抗人 MDM2 抗体、鼠抗人 p53 抗体、鼠抗人 PUMA 抗体购自美国 Santa Cruze Biotechnology 公司;兔抗人 Cleaved caspase-3 抗体、兔抗人 Bax 抗体、兔抗人 Bcl-2 抗体、兔抗人 p-p38MAPK(Thr180/Tyr182)抗体、兔抗人 p38MAPK 抗体和兔抗人 GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司;480 荧光定量 PCR 仪购自美国罗氏公司;Gel Doc XR 凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司;全自动血细胞分析仪购自深圳库贝尔生物科技股份有限公司;全自动生化分析仪购自德国西门子公司。

1.3 方法

1.3.1 尿源性脓毒血症模型构建与动物分组 采用 30 mg/kg 戊巴比妥静脉注射麻醉新西兰兔,取左肋缘最低点作切口(3 cm),在后腹腔找到左肾及输尿管,游离输尿管上段,用 1 号丝线结扎输尿管远端,按 0.5 ml/kg 在输尿管近端注入 10^8 cfu/ml 大肠埃希菌菌液,制备尿源性脓毒血症兔模型[7],术后正常喂养。采用随机数字表法将 60 只新西兰兔分成 4 组,每组 15 只。假手术组(sham):按尿源性脓毒血症模型构建的步骤,游离输尿管上段后,立刻缝合切口,术后正常喂养;尿源性脓毒血症组(Model):按尿源性脓毒血症模型构建步骤进行处理;p38MAPK 抑制剂 SB203580 处理组(SB203580):在尿源性脓毒血症组的基础上,造模前 30 min 给予 30 μg/kg SB203580 溶液静脉注射,1 次/d,干预 3 d;SB203580 + p53 激活剂 Nutlin-3 组(SB203580 + Nutlin-3):在注射 SB203580 溶液同时,给予 128 mg/kg Nutlin-3 溶液腹腔注射,1 次/d,干预 3 d。

1.3.2 大体观察 分别记录造模后 24、48 和 72 h 时各组新西兰兔的肛温、呼吸频率、心率等情况变化。

1.3.3 血清指标检测 在造模后 72 h 取新西兰兔的耳动脉血,利用全自动血液细胞分析仪进行白细胞计数(white blood cell,WBC);全自动生化分析仪检测肾功能指标血肌酐、尿素氮的水平;利用 ELISA 试剂盒检测血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量。

1.3.4 TUNEL 染色观察肾组织细胞凋亡水平 造模后 72 h 取肾组织进行常规石蜡切片,经脱蜡至水,根据 TUNEL 染色试剂盒操作步骤进行染色后,置于荧光显微镜下观察肾组织细胞凋亡情况。

1.3.5 qRT-PCR 法检测肾组织 MDM2 和 p53 mRNA 表达水平 造模后 72 h 取适量肾组织,使用 TRIzol 试剂提取总 RNA。用 PrimeScript RT 试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA,再利用 TB Green® Premix Ex Taq™ Ⅱ试剂盒进行 PCR 扩增检测。目的基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算得出。PCR 引物

序列 MDM2-F: 5′-CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT-3′，MDM2-R: 5′-AGACGTTCAGTCCTGTCC ATAA-3′；p53-F: 5′-ACAGAAACACCTTCCGACAC-3′，p53-R: 5′-CCTGGGCATC CTTTAGCT-3′；GAPDH-F: 5′-ACG-GATTTGGTCGTATTGGG-3′，GAPDH-R: 5′-CGCTC-CTG GAAGATGGTGAT-3′。

1.3.6 Western blot 法检测肾组织凋亡、p38MAPK 信号通路和 p53 凋亡途径相关蛋白表达水平 造模 72 h 后取适量肾组织，加入液氮后充分研磨，RIPA 细胞裂解液溶解，置冰上 30 min，4 ℃ 13 000 r/min 离心 10 min，取上清液。用 BCA 测定蛋白质浓度，取 30 μg 总蛋白，于 12% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离，转移到 PVDF 膜上，加入 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h，分别加入 Cleaved caspase-3(1∶2 000)、Bax(1∶2 000)、Bcl-2(1∶1 000)、p38 MAPK(1∶1 000)、p-p38 MAPK(1∶4 000)、MDM2(1∶500)、p53(1∶200)、PUMA(1∶100) 和 GAPDH(1∶1 000) 抗体，4 ℃ 孵育过夜，用 TBST 缓冲液洗涤 3 次，每次 10 min，加入相应的辣根过氧化物酶标记的第二抗体，室温孵育 2 h，ECL 试剂显色，曝光成像，扫描图像。用 Quantity One V6.42 软件对每个条带的灰度值进行分析，以同一样本中每个靶带的灰度值与 GAPDH 条带灰度值之比作为目标蛋白的定量结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析，用 $\bar{x} \pm s$ 表示计量结果，多组结果的比较采用单因素方差分析(One Way ANOVA)，两两比较采用 LSD-*t* 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制 p38MAPK 信号通路对兔大体观察的影响 与 sham 组比较，Model 组造模后 24、48 和 72 h 兔肛温、呼吸频率和心率均上升($P<0.05$)；与 Model 组比较，SB203580 组造模后 24、48 和 72 h 兔肛温、呼吸频率和心率降低($P<0.05$)；与 SB203580 组比较，SB203580 + Nutlin-3 组造模后 24、48 和 72 h 兔肛温、呼吸频率和心率上升($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组兔肛温、呼吸频率和心率比较($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

组别	肛温(℃)	呼吸频率(次/min)	心率(次/min)
sham			
24 h	38.56±0.11	48.56±2.67	221.62±7.59
48 h	38.39±0.10	47.07±3.02	210.53±5.58
72 h	38.33±0.08	47.05±2.88	208.64±6.14
Model			
24 h	39.72±0.09*	73.46±3.11*	279.61±8.26*
48 h	40.23±0.12*	77.04±2.28*	288.16±9.03*
72 h	40.78±0.06*	82.52±1.95*	312.48±10.39*
SB203580			
24 h	39.03±0.13*#	56.42±2.06*#	235.69±6.89*#
48 h	39.65±0.19*#	58.12±3.13*#	241.32±9.56*#
72 h	38.97±0.17*#	59.33±2.58*#	239.34±8.40*#
SB203580 + Nutlin-3			
24 h	39.51±0.18*#&	65.48±1.84*#&	256.18±6.78*#&
48 h	39.92±0.12*#&	69.71±2.02*#&	263.10±5.63*#&
72 h	40.06±0.08*#&	72.11±2.16*#&	280.02±8.00*#&
F 值	14.45	59.05	28.63
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

与 sham 组比较：* $P<0.05$；与 Model 组比较：# $P<0.05$；与 SB203580 组比较：& $P<0.05$

2.2 抑制 p38MAPK 信号通路对兔血 WBC 和炎症因子指标变化的影响 与 sham 组比较，Model 组兔血 WBC、血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平均上升($P<0.05$)；与 Model 组比较，SB203580 组兔血 WBC、血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平降低($P<0.05$)；与 SB203580 组比较，SB203580 + Nutlin-3 组兔血 WBC、血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平上升($P<0.05$)。见表 2。

2.3 抑制 p38MAPK 信号通路对兔肾功能的影响 与 sham 组比较，Model 组兔肌酐和尿素氮水平均上升($P<0.05$)；与 Model 组比较，SB203580 组兔肌酐和尿素氮水平降低($P<0.05$)；与 SB203580 组比较，SB203580 + Nutlin-3 组兔肌酐和尿素氮水平上升($P<0.05$)。见表 3。

表 2 各组兔血白细胞计数和细胞炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

组别	WBC($\times 10^9$/L)	IL-1β(pg/ml)	IL-6(pg/ml)	TNF-α(pg/ml)
sham	10.27±0.36	53.94±7.62	41.64±5.89	123.64±12.47
Model	20.12±1.61*	186.31±11.78*	200.67±13.43*	412.53±30.41*
SB203580	15.10±0.33*#	99.11±9.71*#	103.25±8.12 *#	223.58±18.41*#
SB203580 + Nutlin-3	18.22±0.59*#&	131.25±8.73*#&	162.48±10.04*#&	284.46±22.59*#&
F 值	349.42	506.54	761.55	453.82
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

与 sham 组比较：* $P<0.05$；与 Model 组比较：# $P<0.05$；与 SB203580 组比较：& $P<0.05$

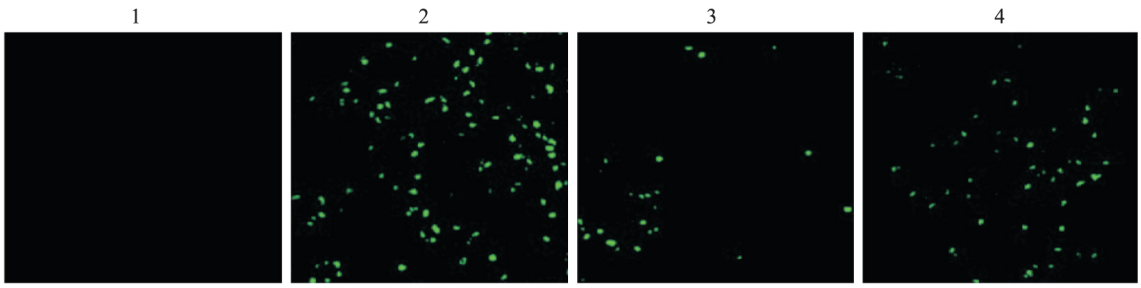

图1 TUNEL 染色观察兔肾组织凋亡情况 ×200

1: sham 组; 2: Model 组; 3: SB203580 组; 4: SB203580 + Nutlin-3 组

表3 各组兔肾功能指标血清比较($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

组别	肌酐(μmol/L)	尿素氮(mmol/L)
sham	51.68 ± 2.58	4.05 ± 0.38
Model	121.37 ± 5.65*	14.46 ± 0.84*
SB203580	84.60 ± 8.39$^{*\#}$	9.52 ± 0.43$^{*\#}$
SB203580 + Nutlin-3	100.21 ± 10.67$^{*\#\&}$	12.17 ± 0.55$^{*\#\&}$
F 值	232.01	900.63
P 值	*P* < 0.01	*P* < 0.01

与 sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 Model 组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与 SB203580 组比较: $^{\&}P < 0.05$

2.4 抑制 p38MAPK 信号通路对兔肾组织凋亡情况的影响 4 组兔肾组织细胞凋亡蛋白 Cleaved caspase-3($F = 531.70$, $P < 0.01$)、Bax($F = 254.51$, $P < 0.01$)和 Bcl-2($F = 471.40$, $P < 0.01$)表达水平有变化,差异有统计学意义。与 sham 组比较,Model 组兔肾组织细胞凋亡水平,Cleaved caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平上升,Bcl-2 蛋白表达水平降低($P < 0.05$);与 Model 组比较,SB203580 组兔肾组织细胞凋亡水平,Cleaved caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平降低,Bcl-2 蛋白表达水平增加($P < 0.05$);与 SB203580 组比较,SB203580 + Nutlin-3 组兔肾组织细胞凋亡水平,Cleaved caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平上升,Bcl-2 蛋白表达水平降低($P < 0.05$)。见图 1、2。

2.5 抑制 p38MAPK 信号通路对兔肾组织 p38MAPK 蛋白表达的影响 4 组兔肾组织 p-p38MAPK 蛋白表达水平有变化,差异有统计学意义($F = 245.10$, $P < 0.01$),而 p38MAPK 蛋白表达水平无变化($F = 0.20$, $P = 0.89$)。与 sham 组比较,Model 组兔肾组织 p-p38MAPK 蛋白表达水平升高($P < 0.05$);与 Model 组比较,SB203580 组兔肾组织 p-p38MAPK 蛋白表达水平降低($P < 0.05$);与 SB203580 组比较,SB203580 + Nutlin-3 组兔肾组织 p-p38MAPK 蛋白表达水平无差异($P > 0.05$)。见图 3。

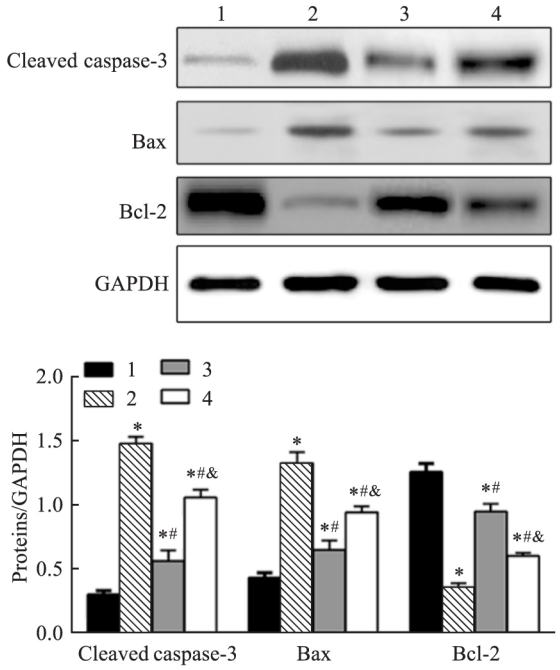

图2 兔肾组织凋亡相关蛋白表达水平比较

1: sham 组; 2: Model 组; 3: SB203580 组; 4: SB203580 + Nutlin-3 组; 与 sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 Model 组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与 SB203580 组比较: $^{\&}P < 0.05$

2.6 抑制 p38MAPK 信号通路对兔肾组织 p53 介导的凋亡途径的影响 4 组兔肾组织 MDM2 mRNA 和蛋白表达水平有变化,差异有统计学意义($F_{mRNA} = 303.30$, $P < 0.01$; $F_{蛋白} = 223.75$, $P < 0.01$);p53 mRNA 和蛋白表达水平有变化,差异有统计学意义($F_{mRNA} = 2\,092.05$, $P < 0.01$; $F_{蛋白} = 469.62$, $P < 0.01$);PUMA 蛋白表达水平有变化,差异有统计学意义($F = 122.80$, $P < 0.01$)。与 sham 组比较,Model 组兔肾组织 MDM2 mRNA 和蛋白表达水平降低,p53 mRNA 和蛋白表达水平,PUMA 蛋白表达水平升高($P < 0.05$);与 Model 组比较,SB203580 组兔肾组织 MDM2 mRNA 和蛋白表达水平升高,p53

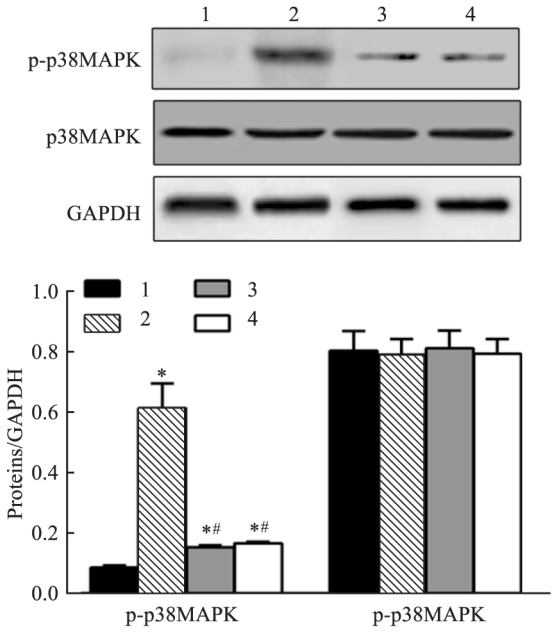

图3 兔肾组织 p38MAPK 蛋白表达水平比较

1: sham 组; 2: Model 组; 3: SB203580 组; 4: SB203580 + Nutlin-3 组; 与 sham 组比较: $^{*}P<0.05$; 与 Model 组比较: $^{\#}P<0.05$

mRNA 及 p53、PUMA 蛋白表达水平降低($P<0.05$); 与 SB203580 组比较, SB203580 + Nutlin-3 组兔肾组织 MDM2 mRNA 和蛋白表达水平无变化($P>0.05$), p53 mRNA 及 p53、PUMA 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。见图4。

3 讨论

脓毒症综合征是机体对感染的复杂炎症反应, 病死率高, 是非心脏重症监护患者死亡的主要原因之一[8]。但在日常临床体检中常常无法及时监测到早期脓毒症。尿源性脓毒症是一种严重的、危及生命的泌尿系感染并发症, 死亡率非常高, 因此, 迅速发现尿源性脓毒症并开始适当的治疗十分重要[9]。当外界感染刺激机体免疫系统如 Toll 样受体等, 会导致大量促炎性细胞因子(如 IL-1 和 IL-6)分泌。在初始促炎阶段之后, 会出现一个反调节的抗炎反应, 导致免疫抑制状态。目前, 尿源性脓毒症所致的肾损伤机制尚不清楚, 大多数普遍认为, 血流动力改变、炎症介质、免疫抑制和细胞凋亡与机体功能紊乱密切相关, 其中炎症介质是核心因素[10]。因此本研究从炎症介质和细胞凋亡探讨尿源性脓毒症所致肾损伤的可能机制理论上可行。本研究结果表明, 尿源性脓毒症新西兰兔肛温、呼吸频率、心率、血 WBC、血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平均升高, 说明尿源性脓毒症兔体内炎症反应加剧。已有研究证

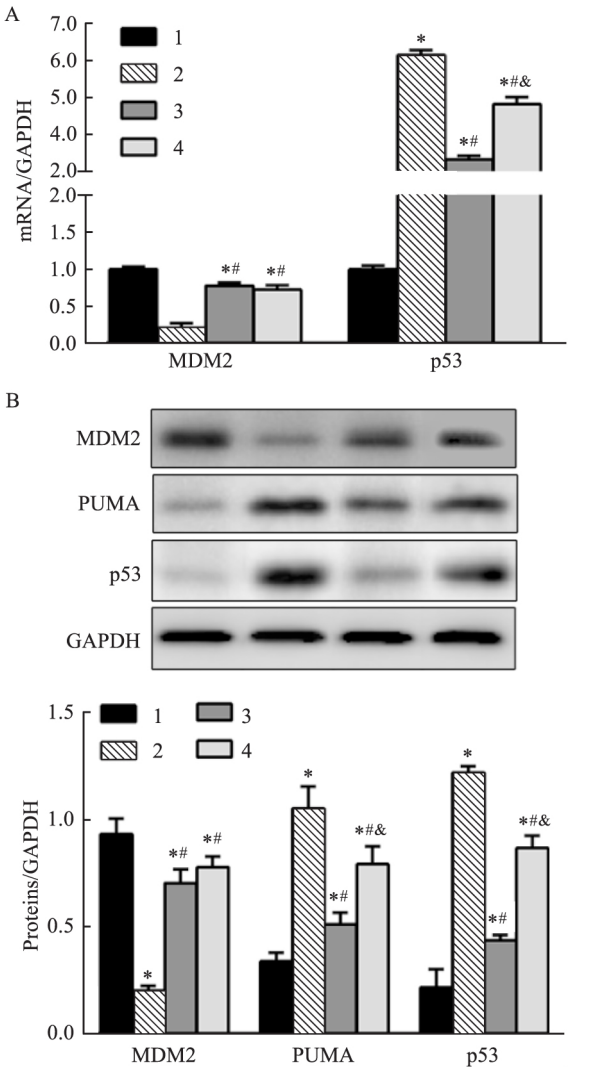

图4 兔肾组织 p53 介导的凋亡途径相关 mRNA 和蛋白表达水平比较

A: qRT-PCR 检测肾组织中 p53 和 MDM2 mRNA 表达水平; B: Western blot 检测肾组织中 MDM2, PUMA 和 p53 蛋白表达水平; 1: sham 组; 2: Model 组; 3: SB203580 组; 4: SB203580 + Nutlin-3 组; 与 sham 组比较: $^{*}P<0.05$; 与 Model 组比较: $^{\#}P<0.05$; 与 SB203580 组比较: $^{\&}P<0.05$

实[5], 尿源性脓毒症后出现的肾损伤并发症可能是通过炎症因子诱导肾细胞凋亡引起的。本研究结果表明, 尿源性脓毒症兔血肌酐、尿素氮含量、肾组织细胞凋亡水平增加, 说明尿源性脓毒症兔出现严重肾损伤。与之前的研究结果一致, 提示尿源性脓毒症新西兰兔动物模型构建成功。

MAPK 包括三大类: p42/44 细胞外信号调节 D 激酶(ERK), c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 p38 激酶[11]。p38MAPK 信号通路作为 MAPK 家族中的重要组成部分, 在炎症、细胞应激、凋亡和细胞周期等多种生理病理过程中具有重要作用。已有研究证

明[12]，山楂叶总黄酮通过下调糖尿病肾病大鼠肾组织 p38MAPK 信号通路活性，改善氧化应激对肾组织的损伤。另有研究发现[13]，p38MAPK 通路在脓毒症新生大鼠脑组织中异常激活，诱导脑组织炎症、氧化应激和细胞凋亡。采用 p38MAPK 信号通路抑制剂 SB203580 干预后，脑组织炎症、氧化应激和细胞凋亡情况均被逆转。SB203580 是 p38MAPK 的一种有效抑制剂，广泛应用于各种实验动物模型[14]。SB203580 通过与 p38MAPK 上的 ATP 结合位点结合抑制 p38MAPK 活性，阻止下游靶点磷酸化，但不能改变 p38MAPK 的表达水平。本研究结果表明，SB203580 能逆转尿源性脓毒症兔各检测指标，并且有效抑制肾组织磷酸化 p38MAPK 水平，但对 p38MAPK 本底蛋白表达水平无影响，验证了 p38MAPK 抑制剂 SB203580 对 p38MAPK 磷酸化的抑制作用。

p53 作为肿瘤抑制蛋白，通过转录调控下游靶基因参与细胞周期和凋亡过程。p53 激活后，通过激活促凋亡基因(如 Bax)诱导细胞凋亡，同时，还能与抗凋亡线粒体蛋白(如 Bcl-2)结合直接诱导细胞凋亡[15]。研究发现[16]，脓毒症大鼠肾组织细胞凋亡率升高，细胞促凋亡蛋白 Bax 和 Cleaved caspase-3 相对表达量升高，抗凋亡蛋白 Bcl-2 相对表达量降低。脓毒症肾损伤通过 caspase-3 诱导细胞凋亡，且呈时间依赖性[17]。研究证明[5]，脓毒血症组的肾组织凋亡细胞集中成团，凋亡细胞布满整个视野，凋亡指数高于假手术组。这些研究说明，脓毒症诱导肾组织细胞凋亡。已有研究证实[18]，调节 p53 蛋白降解的分子是 MDM2。MDM2 是 p53 的典型 E3 泛素连接酶，也是 p53 靶基因之一。p38MAPK 诱导 p53 磷酸化导致其与 MDM2 脱节，从而避免泛素蛋白酶体降解，表明 p38MAPK 以翻译后方式调节 MDM2 和 p53 表达。目前，没有研究清楚阐明 p38MAPK 如何介导 MDM2 的降解。p38MAPK 可能直接磷酸化 MDM2，导致其通过蛋白酶体途径降解。另外，p38MAPK 可能与其他分子相互作用来调节 MDM2 的稳定性。研究发现[19]，MDM2 活性的抑制提高了 p53 的稳定性，通过增强 MDM2-E3 连接酶活性促进 p53 降解。本研究结果表明，SB203580 能上调 MDM2 表达水平，抑制 p53 和 PUMA 表达水平，加入 p53 激活剂 Nutlin-3 干预后，能逆转 SB203580 干预后尿源性脓毒症兔的各项检测指标，但 Nutlin-3 只能上调肾组织 PUMA 和 p53 的表达水平，无法调控 MDM2 和 p-p38MAPK 的表达水平，这是由于 p53 激活剂 Nutlin-3 的作用原理是与 MDM2 结合，进而抑制 MDM2 对 p53 蛋白的降解，与 p53 蛋白是竞争关系，因此无法调控其结合蛋白 MDM2 的表达水平，也对上游 p-p38MAPK 蛋白表达水平无影响。

综上所述，在尿源性脓毒症兔中，抑制 p38MAPK 信号通路能促进 MDM2 蛋白表达，诱导 p53 蛋白降解，进而抑制 p53 介导的肾细胞凋亡，缓解尿源性脓毒症引起的肾损伤。

参考文献

[1] Dellinger R P, Levy M M, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012 [J]. Intensive Care Med, 2013, 39(2): 168 - 228.

[2] Cek M, Tangdogdu Z, Wagenlehner F, et al. Healthcare-associated urinary tract infections in hospitalized urological patients-a global perspective: results from the GPIU studies [J]. World J Urol, 2014, 32(6): 1587 - 94.

[3] Martin G S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012, 10(6): 701 - 6.

[4] Yao S, Fan L Y, Lam E W. The FOXO3-FOXM1 axis: a key cancer drug target and a modulator of cancer drug resistance [J]. Semin Cancer Biol, 2018, 50: 77 - 89.

[5] 邹 雄，陈 仙，唐亚纯，等. 硫化氢对尿源性脓毒血症肾细胞凋亡的影响及其机制 [J]. 医学研究生学报，2020，33(7)：702 - 7.

[6] Park S H, Seong M A, Lee H Y. p38 MAPK-induced MDM2 degradation confers paclitaxel resistance through p53-mediated regulation of EGFR in human lung cancer cells [J]. Oncotarget, 2016, 7(7): 8184 - 99.

[7] 许武军，谢娟娟，陈 仙. H2S 通过抑制 TLR4/MyD88/PI3K 信号通路减轻尿源性脓毒血症诱导的急性肾损伤 [J]. 中国病理生理杂志，2019，35(2)：243 - 7.

[8] Prescott H C, Angus D C. Enhancing recovery from sepsis: a review [J]. JAMA, 2018, 319(1): 62 - 75.

[9] Wagenlehner F M, Lichtenstern C, Rolfes C, et al. Diagnosis and management for urosepsis [J]. Int J Urol, 2013, 20(10): 963 - 70.

[10] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis [J]. Nature, 2002, 420(6917): 885 - 91.

[11] Lin R C, Yang S F, Chiou H L, et al. Licochalcone a-induced apoptosis through the activation of p38MAPK pathway mediated mitochondrial pathways of apoptosis in human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Cells, 2019, 8(11): 1441.

[12] 覃春美，李 刚，程宗华，等. 山楂叶总黄酮调控肾组织 p38MAPK 信号通路干预糖尿病肾病大鼠氧化应激损伤的实验研究 [J]. 检验医学与临床，2019，16(21)：3131 - 4.

[13] Zhou R, Qu Y, Huang Q, et al. Recombinant CC16 regulates inflammation, oxidative stress, apoptosis and autophagy *via* the inhibition of the p38MAPK signaling pathway in the brain of neonatal

rats with sepsis [J]. Brain Res,2019,1725:146473.
[14] Pan Y X,Chen K F,Lin Y X,et al. Intracisternal administration of SB203580,a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor,attenuates cerebral vasospasm *via* inhibition of tumor-necrosis factor-α [J]. J Clin Neurosci,2013,20(5):726-30.
[15] 孙 鹏,赵富云. p53 基因相关的细胞非经典死亡 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2019,26(5):577-82.
[16] 卜 克,王 璐,王 伟,等. H2S 对脓毒症大鼠急性肾损伤保护作用及机制研究 [J]. 实验与检验医学,2018,36(3):312-6.
[17] 向镜芬,杨 祥,龚剑锋,等. PI3K/Akt 信号通路在脓毒症肾脏损伤诱导的自噬中的调节作用 [J]. 中国病理生理杂志,2014,30(6):1052-8.
[18] Zhao K,Yang Y,Zhang G,et al. Regulation of the Mdm2-p53 pathway by the ubiquitin E3 ligase MARCH7 [J]. EMBO Rep,2018,19(2):305-19.
[19] Qian F,Tang T,Wang S,et al. CacyBP/SIP protein reduces p53 stability by enhancing Mdm2 activity in p53 mutant glioma cells [J]. Neoplasma,2021,68(1):119-25.

Effect of inhibiting p38MAPK signaling pathway on apoptosis of renal tissue in rabbits with urosepsis and its mechanism

Tang Yachun[1],Xu Wujun[2],Chen Xian[2],et al
([1]*Dept of Urology,South China Hospital Affiliated to NanHua University,Hengyang* 421002;
[2]*Dept of Urology,The Second Affiliated Hospital of South China University,Hengyang* 421001)

Abstract ***Objective*** To investigate the effect of inhibition of p38MAPK signaling pathway on renal cell apoptosis in rabbits with urosepsis and its mechanism. ***Methods*** Sixty New Zealand rabbits were randomly divided into 4 groups: sham operation group (sham),model group (model),p38MAPK inhibitor SB203580 group (SB203580) and SB203580 + p53 activator Nutlin-3 group (SB203580 + Nutlin-3),with 15 rabbits in each group. The urosepsis model was made by injecting Escherichia coli into the proximal end of the ureter. Intravenous injection of 30 μg/kg SB203580 or intraperitoneal injection of 128 mg/kg Nutlin-3 was used for intervention at 30 minutes before the operation,once daily,for a total of 3 d. The rectal temperature,respiratory rate and heart rate of the 4 groups of New Zealand rabbits were recorded at 24 h,48 h and 72 h after operation. The automatic analyzer detected the white blood cell count,serum creatinine and urea nitrogen content. ELISA was used to detect the levels of serum Interleukin-1β (IL-1β),Interleukin-6 (IL-6) and Tumor necrosis factor-α (TNF-α). Renal tissue was taken for TUNEL staining to observe the apoptosis; qRT-PCR method was used to detect the expression of MDM2 and p53 mRNA in renal tissue; Western blot method was used to detect the expression of Cleaved caspase-3,Bax,Bcl-2,p38MAPK,p-p38MAPK,MDM2,p53 and PUMA protein levels in renal tissue. ***Results*** Compared with the Model group,rabbits rectal temperature,respiratory rate,heart rate,white blood cell count,serum IL-1β,IL-6 and TNF-α levels,and serum creatinine and urea nitrogen levels reduced in the SB203580 group ($P<0.05$),and cell apoptosis rate of renal tissue,the mRNA expression of p53 and the proteins expression of p53,Cleaved caspase-3,Bax,PUMA and p-p38MAPK decreased ($P<0.05$),while the expression levels of MDM2 mRNA and MDM2,Bcl-2 proteins increased ($P<0.05$). Compared with the SB203580 group,the rabbits rectal temperature,respiratory rate,heart rate,white blood cell count,serum IL-1β,IL-6 and TNF-α levels,and serum creatinine and urea nitrogen levels increased in the SB203580 + Nutlin-3 group ($P<0.05$),and renal cell apoptosis rate,the mRNA expression of p53 and the proteins expression of p53,Cleaved caspase-3,Bax and PUMA increased ($P<0.05$),the protein expression of Bcl-2 significantly decreased ($P<0.05$),while the expression of MDM2 mRNA and MDM2,p-p38MAPK proteins had no changes ($P>0.05$). ***Conclusion*** Inhibition of p38MAPK signaling pathway inhibits the p53-mediated apoptosis pathway by promoting the expression of MDM2,thereby reducing renal cell apoptosis in rabbits with urosepsis.

Key words p38MAPK signaling pathway; urosepsis; p53; cell apoptosis