

## P38 抑制剂 SB203580 对小鼠辐射致死效应和小肠损伤的保护作用

常建辉<sup>1</sup>, 张恒<sup>1</sup>, 关方霞<sup>2</sup>, 王月英<sup>1</sup>, 李德冠<sup>1</sup>, 吴红英<sup>1</sup>, 王成春<sup>2</sup>,  
周长辉<sup>2</sup>, 翟志斌<sup>1</sup>, 路璐<sup>1</sup>, 王小春<sup>1</sup>, 侯琦<sup>3</sup>, 孟爱民<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室, 天津 300192;  
2. 郑州大学生物工程系, 河南 郑州 450051; 3. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

**摘要:** 本研究主要观察 p38 抑制剂 SB203580 对小鼠辐射致死效应和小肠损伤的保护作用。在小鼠辐射致死效应实验中, 随机分为对照组、照射组和照射给药组。对照组给予假照射, 其他两组接受 7.2Gy 照射, 照射给药组在照射前 0.5 h 腹腔注射给药, 以后隔天给药 (共 5 次), 观察小鼠 30 天生存率。小肠损伤保护实验中分组和照射剂量相同。24 h 后处死小鼠并取小肠组织进行 HE 及免疫组化染色。结果显示, 照射给药组小鼠 30 天生存率比照射组提高 40%。与照射组相比, 照射给药组的小肠隐窝细胞 p-p38、p53 表达下降, 凋亡细胞数量下降, Ki67 表达升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。结果表明, SB203580 特异性抑制全身照射小鼠小肠隐窝细胞 p38 激活及 p53 表达升高, 小肠隐窝细胞凋亡减少, 增殖能力提高, 30 天小鼠生存率提高。提示 SB203580 对小鼠辐射致死效应和小肠损伤有一定保护作用, p38 通路在辐射致死效应和辐射诱导小肠上皮细胞损伤中起着一定的作用。

**关键词:** SB203580; 辐射损伤; 生存率; 细胞凋亡; p38 通路

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 04-0395-05

## The protective effects of SB203580 against mortality and radiation induced intestinal injury of mice

CHANG Jian-hui<sup>1</sup>, ZHANG Heng<sup>1</sup>, GUAN Fang-xia<sup>2</sup>, WANG Yue-ying<sup>1</sup>, LI De-guan<sup>1</sup>,  
WU Hong-ying<sup>1</sup>, WANG Cheng-chun<sup>2</sup>, ZHOU Chang-hui<sup>2</sup>, ZHAI Zhi-bin<sup>1</sup>, LU Lu<sup>1</sup>,  
WANG Xiao-chun<sup>1</sup>, HOU Qi<sup>3</sup>, MENG Ai-min<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical Collage,  
Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Tianjin 300192, China;

2. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450051, China;

3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** This study is to investigate the protective effects of the SB203580 against radiation induced mortality and intestinal injury of mice. A total of 67 male C57BL/6 mice (20.0–22.0 g) were matched according to body weight and randomly assigned to one of three groups: control, total body irradiation exposure (IR, 7.2Gy) only, and IR (7.2Gy) + SB203580 (15 mg·kg<sup>-1</sup>). 30 days survival rate was observed in the experiment. In intestinal injury experiment, the expression levels of caspase-3, Ki67, p53 and p-p38 were assayed in the mice intestine crypts. The results showed that the 30 days survival rate was 100% (control), 0 (IR) and 40% (IR + SB203580), separately. Compared to the IR groups, the positive cells of caspase-3, p53 and p-p38 in crypt cells decreased 33.00%, 21.78% and 34.63%, respectively. The rate of positive cells of Ki67 increased 37.96%.

收稿日期: 2010-10-29.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30770645, 30828011, 81072237); 天津市自然科学基金资助项目 (08JCYBJC07300); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 重大专项 (2011CB964800-G).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-22-85682353, E-mail: aiminmeng00@yahoo.com

Significant difference was found between all of them ( $P < 0.01$ ). SB203580 potentially protected against radiation-induced lethal and intestinal injury in mice, and it may be a potential radio protector.

**Key words:** SB203580; radiation damage; survival rate; apoptosis; p38 pathway

腹腔局部放疗是腹部和骨盆部肿瘤治疗一种基本的方法。虽然射线会集中在肿瘤部位, 但其他正常组织不可避免的会受到影响。另外, 在核事故以及白血病等的放疗也可引起对消化道特别是肠的损伤<sup>[1]</sup>。小肠组织对射线极为敏感, 电离辐射可导致小肠隐窝上皮细胞发生暂时性增殖抑制及部分细胞变性坏死、凋亡等异常改变, 使绒毛上皮的更新受阻, 破坏了绒毛上皮结构的完整性, 进而引起肠屏障功能障碍甚至引发菌血症和毒血症导致个体死亡<sup>[2]</sup>。肠型放射病是引起患者急性胃肠症状和致死的重要原因。探讨细胞辐射损伤机制、开发细胞保护剂保护胃肠细胞辐射损伤具有重要的意义。

P38MAPK 属于丝裂原活化蛋白激酶家族, 是重要的应激通路蛋白。p38MAPK 信号传导通路在炎症、应激、凋亡、细胞周期和生长的多种生理和病理过程中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。小肠受到辐射后会发上皮细胞凋亡, 并引发炎症坏死。对于 p38MAPK 在  $\gamma$ -辐射诱导的肠细胞凋亡过程中起的作用还存在争论<sup>[2, 4]</sup>。作者在预实验中发现, 应用 p38 特异性抑制剂 SB203580 可明显提高小鼠 30 天生存率, 7 天生存率也明显升高。推测 p38MAPK 在  $\gamma$ -辐射诱导的肠细胞凋亡或炎症过程中有一定作用, 需进一步研究证明。

p38 特异性抑制剂 SB203580 可以通透细胞, 竞争性结合到 p38 MAPK ATP 结合位点, 抑制后续 MAPKAP Kinase-2 和 MAPKAP Kinase-3 的激活。在哺乳动物中, SB203580 对炎症有抑制作用<sup>[5]</sup>。本研究应用 p38 特异性抑制剂 SB203580, 观察 SB203580 对全身照射小鼠的保护作用, 并检测小肠内 p-p38、p53、caspase-3 及 Ki67 的表达, 观察 SB203580 对小鼠辐射致死效应和小肠损伤的保护作用, 探讨 p38 通路在辐射诱导的隐窝细胞凋亡过程中可能的分子机制, 并为临床辐射防护剂研发提供实验依据。

## 材料与方

**实验动物及材料** C57BL/6 雄性小鼠 (SPF 级, 67 只) 由中国医学科学院动物研究所提供, 合格证号 [SCXK(京) 2005-0013], 体重 20.0~22.0 g。p38 抑制剂 SB203580 为 LC 公司产品, 批号 S-3400, 相对分子质量 377.4, 白色粉末状固体, 纯度 99%。Cleaved

Caspase-3 单克隆抗体为 RD 公司产品, 克隆号 269518; Ki67 多克隆抗体为 Abcam 公司产品, 货号 ab66155; p53 多克隆抗体为 Santa Cruz Biotechnology 公司产品, 货号 SC1312; Anti-ACTIVE p38 多克隆抗体 (p-p38) 为 Promega 公司产品, Part No. V121A。免疫组化染色试剂盒 (二抗, DAB 等) 为北京中山金桥生物技术有限公司产品。

照射条件:  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线辐射源购自加拿大原子能有限公司 (剂量率为  $0.76 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ ), 小鼠接受全身一次性照射, 剂量为 7.2Gy。

**小鼠辐射致死效应实验** 将小鼠按体重随机分为正常对照组 (control)、照射组 (irradiation, IR) 和照射给药组 (IR+SB203580), 每组 15 只。正常对照组给予假照射, 其他两组接受 7.2Gy 照射, 照射给药组在照射前 0.5 h 腹腔注射给予 SB203580 ( $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 以后隔天给药 (共 5 次), 正常对照组和照射组注射相同体积对照溶液, 用药剂量和给药方式是根据参考文献<sup>[6]</sup>及作者预实验结果制定。观察小鼠 30 天生存率。

**小肠损伤保护实验** 将小鼠按体重随机分为正常对照组 ( $n = 6$ )、照射组和照射给药组 ( $n = 8$ )。正常对照组给予假照射, 其他两组接受 7.2Gy 照射, 照射给药组在照射前 0.5 h 腹腔注射给予 SB203580 ( $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 正常对照组和照射组注射相同体积对照溶液。

**实验取材** 照射 24 h 后颈椎脱臼处死小鼠, 取小肠组织, 依次用预冷 PBS、10%中性福尔马林冲洗内容物。然后将小肠切成小段, 用医用透气胶带成捆包扎, 固定, 24 h 后脱水并制作石蜡块。

**HE 染色和免疫组化实验** 小肠组织 HE 染色采用传统实验方法。镜下通过形态学变化计数小肠隐窝内凋亡细胞数量。小肠组织内几种蛋白表达检测参考试剂说明书采用免疫组化两步法检测。主要步骤: 脱蜡,  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柠檬酸盐  $95^\circ\text{C}$  修复 30 min, 10%过氧化氢室温孵育 10 min, 第一抗体  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 第二抗体  $37^\circ\text{C}$  孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水封片。然后盲法镜下计数每只小鼠 50 个完整小肠隐窝阳性细胞数。完整隐窝标准: 切面在隐窝中心, 可见清晰、完整的隐窝腔, 隐窝底部有 4~6 个分泌

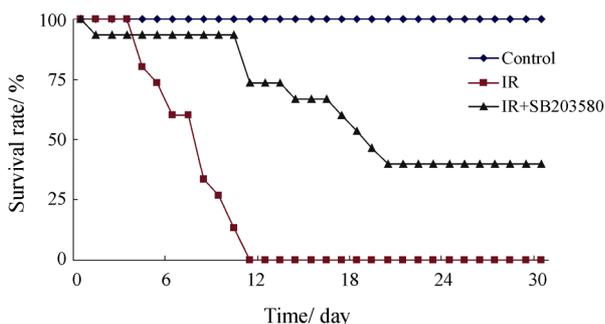
细胞,分泌细胞至隐窝顶部每侧至少有 10 个隐窝上皮细胞<sup>[7]</sup>。

**数据处理** 生存率用百分数表示,两组间比较采用卡方检验。其他数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验。

## 结果

### 1 SB203580 对全身照射小鼠的生存保护作用

照射后 7 天,对照组、照射组和照射给药组小鼠的存活率分别为 100.0%、60.0%和 93.3%,照射给药组与照射组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。对照组的 30 天生存率为 100%,照射组第 11 天全部死亡,照射给药组的生存率为 40%;照射给药组与照射组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。照射组和照射给药组的死亡小鼠的平均生存天数分别为 7.5 和 13.6 天 ( $P < 0.01$ )。给药后可明显减少全身照射小鼠的急性期死亡率,小鼠的 30 天生存率也升高,说明 SB203580 对全身照射小鼠有一定保护作用 (图 1)。



**Figure 1** Effect of SB203580 ( $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) on 30 days survival rate of mice exposed to total body irradiation (IR)

### 2 SB203580 对全身照射小鼠小肠损伤的保护作用

**2.1 SB203580 对全身照射小鼠小肠隐窝细胞凋亡的影响** 小肠隐窝 HE 染色和 caspase-3 染色的结果见表 1 和图 2。在小肠隐窝 HE 染色结果中,照射组和照射给药组的每个隐窝平均凋亡细胞数量均比对照组升高 ( $P < 0.001$ )。与照射组比较,照射给药组的每个隐窝平均凋亡细胞数量下降 30.14% ( $P < 0.001$ )。在小肠隐窝 caspase-3 免疫组化染色结果中,对照组的阳性细胞较少。照射组的每个隐窝平均凋亡细胞数量均比对照组明显升高 ( $P < 0.001$ )。与照射组比较,照射给药组的每个隐窝平均凋亡细胞数量下降 33.00% ( $P < 0.001$ )。两种染色方法的显示结果相近。

**2.2 SB203580 对全身照射小鼠小肠隐窝细胞 Ki67 表达的影响** 小鼠小肠隐窝细胞 Ki67 免疫组化染色

**Table 1** Effect of SB203580 ( $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) on the intestine crypt cells apoptosis of mice exposed to total body irradiation.  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs control group;  $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$  vs IR group. Unit: The average apoptosis cells in every crypt (HE) or the average positive cells in every crypt of caspase-3

Group	n	HE	Caspase-3
Control	6	$0.14 \pm 0.02$	$0.01 \pm 0.01$
IR	8	$1.98 \pm 0.25^{***}$	$0.51 \pm 0.07^{***}$
IR + SB203580	8	$1.39 \pm 0.21^{***\Delta\Delta\Delta}$	$0.34 \pm 0.08^{***\Delta\Delta\Delta}$

见图 2。每个小肠隐窝平均 Ki67 阳性细胞数分别为:对照组  $17.92 \pm 0.22$ ,照射组  $8.63 \pm 1.20$ ,照射给药组  $11.90 \pm 1.62$ 。与对照组比较,照射组和照射给药组的每个隐窝 Ki67 阳性细胞数量分别降低 51.85%和 33.57% ( $P < 0.001$ )。与照射组比较,照射给药组的每个隐窝平均 Ki67 阳性细胞数量升高 37.96% ( $P < 0.01$ )。

**2.3 SB203580 对全身照射小鼠小肠隐窝细胞 p53 表达的影响** 小肠隐窝 p53 染色结果见表 2 和图 2。结果显示,照射组和照射给药组的每个隐窝 p53 阳性细胞数量均比对照组有显著升高 ( $P < 0.001$ )。与照射组比较,照射给药组的每个隐窝平均 p53 阳性细胞数量降低 21.78% ( $P < 0.001$ )。

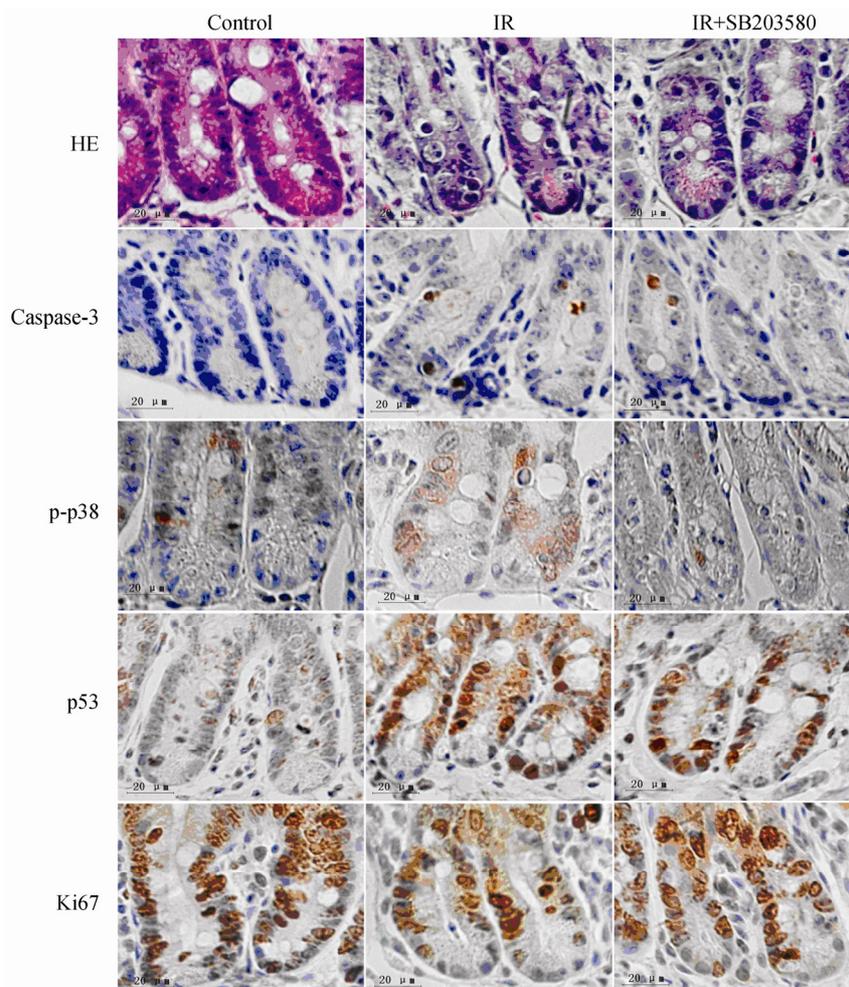
**2.4 SB203580 对全身照射小鼠小肠隐窝细胞 p-p38 表达的影响** 小肠隐窝 p-p38 染色结果见表 2 和图 2。结果显示,照射组的每个隐窝 p-p38 阳性细胞表达率比对照组升高,照射给药组比照射组降低 29.20% ( $P < 0.01$ )。与照射组比较,照射给药组的每个隐窝平均 p-p38 阳性细胞数量降低 34.63% ( $P < 0.001$ )。

**Table 2** Effect of SB203580 ( $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) on the positive cells of p53 and p-p38 in crypt cells.  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group;  $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$  vs IR group. Unit: The average positive cells in every crypt of p53 or p-p38

Group	n	p53	p-p38
Control	6	$1.36 \pm 0.15$	$1.61 \pm 0.24$
IR	8	$9.74 \pm 1.27^{***}$	$1.74 \pm 0.24$
IR + SB203580	8	$7.62 \pm 1.59^{***\Delta\Delta\Delta}$	$1.14 \pm 0.22^{***\Delta\Delta\Delta}$

## 讨论

在辐射暴露不同剂量下小鼠会出现骨髓性放射病,肠型放射病或脑型放射病。肠型放射损伤致死多出现在受照后 7 天之内。作者参考文献并根据预实验采取隔天给药方式,连续给药 5 次,给药剂量为  $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,可以抑制 p38 表达升高和 p38 下游蛋白表达,并观察急性抑制 p38 表达是否能对脏器产生保护作用。本实验应用 p38 特异性抑制剂 SB203580,发现提前 0.5 h 给药后可明显提高小鼠 30 天生存率,并且



**Figure 2** Effect of SB203580 ( $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) on radiation-induced apoptosis and expression of p-p38, p53, and Ki67 in murine small intestinal epithelium

7天生存率也明显升高。作者推测 SB203580 降低小鼠小肠辐射损伤, 提高照射后小鼠生存率。因此作者继续研究了 SB203580 对全身照射小鼠小肠的保护作用。

作者的研究结果显示, SB203580 特异抑制受照小鼠小肠隐窝细胞 p38 激活及 p53 表达升高, 减少小肠隐窝细胞凋亡, 提高细胞增殖能力, 降低全身照射小鼠死亡率, 并且对 7 天内急性死亡保护作用十分明显。

小肠组织对放射线较为敏感, 电离辐射可导致小肠隐窝上皮细胞凋亡增加, 正常功能受到影响, 引发放射性肠炎等疾病, 严重时可致死。电离辐射诱导小肠隐窝上皮细胞凋亡与多个通路有关。目前比较明确的有 p53 途径和 NF- $\kappa$ B 通路。Potten<sup>[2]</sup>发现, 辐射诱导小肠隐窝细胞凋亡与 p53 有关系。Merritt 等<sup>[8]</sup>发现, 野生型小鼠接受 8Gy 全身照射后 4.5 h 计数 200 个隐窝断面, 可以观察到 400 个以上的凋亡细胞, 而 p53

敲除小鼠只有 10~30 个。电离辐射可快速诱导隐窝细胞 p53 蛋白表达增高, 表达强度受辐射剂量和照射时间的影响<sup>[9]</sup>。作者的研究结果显示, 照射 24 h 后小鼠小肠隐窝细胞内 p53 表达比对照组升高约 6 倍。

Wang 等<sup>[10]</sup>发现电离辐射可激活肠上皮细胞 NF- $\kappa$ B 通路, 并且存在剂量和时间的依赖性。利用 NF- $\kappa$ B p50 敲除小鼠和野生型对照研究发现: 肠上皮细胞 NF- $\kappa$ B 激活受抑制, 隐窝细胞凋亡增加, 敲除小鼠对辐射更敏感, 辐射后死亡率较野生型显著增高; 而辐射敏感组织骨髓细胞和脾脏淋巴结以及不敏感的肝脏、心脏、肺和肾脏的细胞凋亡率无明显改变。这提示 NF- $\kappa$ B p50 依赖通路的激活对肠上皮细胞有特殊的辐射保护作用。

P38MAPK 属于应急通路蛋白, 参与炎症、应激、凋亡、细胞周期和生长等多种生理过程。对于电离辐射是否诱导 P38 通路激活还有争议。Giannakis 等<sup>[4]</sup>通过组织化学染色发现, p38 高表达于正常小鼠隐窝

基底部,被认为是隐窝干细胞的位置。Wang 等<sup>[11]</sup>发现,在正常状态下,绒毛细胞有较强的 p38 的激活,电离辐射仅微弱上调隐窝细胞 p38 的磷酸化水平,而绒毛细胞 p38 的磷酸化水平反而有所降低。在本实验中,照射后隐窝细胞 p38 的磷酸化水平比对照上升 8.3%,与 Wang 等的结果一致。

研究发现在某些肿瘤细胞中,活化的 p38 可以直接磷酸化 p53,激活后的 p53 可介导细胞凋亡<sup>[12]</sup>。在小肠组织中 p38 与 p53 的关系未见相关研究。作者研究发现,SB203580 抑制 p53 部分表达,提示照射诱导 p38 激活,可能通过 p53 磷酸化参与小肠细胞凋亡。

在 SB203580 对全身照射小鼠小肠保护作用实验中发现,SB203580 明显抑制了小肠隐窝细胞内 p-p38、p53 和 caspase-3 的表达,并且提高了小肠隐窝上皮增殖能力。p38 可能通过部分抑制 p53,降低细胞凋亡水平。提示 p38 通路可能在辐射诱导小肠细胞死亡增多、增殖抑制损伤效应中起着一定的作用,并且与辐射诱导的 p53 升高有关。SB203580 对辐射后小肠隐窝上皮细胞的保护作用可能是应用 SB203580 后小鼠生存率提高原因,并提示 p38 抑制剂可能是潜在的辐射防护剂,可用于辐射暴露事故人员和腹部放疗引起的放射性肠炎治疗。但由于 SB203580 毒性较大,限制了其临床应用。目前已有上百种 p38 MAPK 抑制剂被报道,但主要还停留在临床前试验阶段,寻找更为有效和低毒的 p38 抑制剂非常紧迫<sup>[13]</sup>。

## References

- [1] Onal C, Topkan E, Efe E, et al. Comparison of rectal volume definition techniques and their influence on rectal toxicity in patients with prostate cancer treated with 3D conformal radiotherapy: a dose-volume analysis [J]. *Radiat Oncol*, 2009, 4: 14.
- [2] Potten CS. Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine [J]. *Radiat Res*, 2004, 161: 123-136.
- [3] Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773: 1358-1375.
- [4] Giannakis M, Stappenbeck TS, Mills JC, et al. Molecular properties of adult mouse gastric and intestinal epithelial progenitors in their niches [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 11292-11300.
- [5] Peifer C, Wagner G, Laufer S. New approaches to the treatment of inflammatory disorders small molecule inhibitors of P38 MAP kinase [J]. *Curr Top Med Chem*, 2006, 6: 113-149.
- [6] Bulavin DV, Phillips C, Nannenga B, et al. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway [J]. *Nat Genet*, 2004, 36: 343-350.
- [7] Potten CS, Merritt A, Hickman J, et al. Characterization of radiation induced apoptosis in the small intestine and its biological implications [J]. *Int J Radiat Biol*, 1994, 65: 71-78.
- [8] Merritt AJ, Allen TD, Potten CS, et al. Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation [J]. *Oncogene*, 1997, 14: 2759-2766.
- [9] Wilson JW, Pritchard DM, Hickman JA, et al. Radiation-induced p53 and p21WAF-1/CIP1 expression in the murine intestinal epithelium: apoptosis and cell cycle arrest [J]. *Am J Pathol*, 1998, 153: 899-909.
- [10] Wang Y, Meng A, lang H, et al. Activation of nuclear factor  $\kappa$ B *in vivo* selectively protects the murine small intestine against ionizing radiation-induced damage [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 6240-6246.
- [11] Wang FC. Experimental Study on Mechanisms Involved in Intestinal Epithelial Cell Damage Caused by Whole Body Irradiation and Endotoxin Stress (电离辐射与内毒素致小肠上皮细胞损伤机制的实验研究) [D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2006: 58-72.
- [12] Bulavin DV, Demidov ON, Saito S, et al. Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity [J]. *Nat Genet*, 2002, 31: 210-215.
- [13] Zhou WD, Chen QH, Chen QX. The action of p38 MAP kinase and its inhibitors on endometriosis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 548-554.