

# 冷保存再灌注期间离体肝组织内氧自由基及 $[Ca^{2+}]_i$ 对p38MAPK 激活的影响

王 雨, 田伏洲, 汤礼军, 张晓琼

王雨, 田伏洲, 汤礼军, 张晓琼, 中国人民解放军成都军区总医院全军普通外科中心 四川省成都市 610083  
王雨, 男, 1969-11-20 生, 四川省宣汉县人, 汉族. 1993 年华西医科大学本科毕业, 2001 年第三军医大学博士研究生毕业, 主治医师. 主要从事肝胆及胰腺外科的研究.  
项目负责人: 王雨, 610083, 四川省成都市天回镇, 中国人民解放军成都军区总医院全军普通外科中心. wangyu666@Hotmail.com  
电话: 028-86570353  
收稿日期: 2002-03-15 接受日期: 2002-08-23

## Effect of OFR and $[Ca^{2+}]_i$ on the activation of p38 MAPK in isolated rabbit liver during cold preservation and reperfusion period

Yu Wang, Fu-Zhou Tian, Li-Jun Tang, Xiao-Qiong Zhang

Yu Wang, Fu-Zhou Tian, Li-Jun Tang, Xiao-Qiong Zhang, The General Surgery Center of PLA, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China  
Correspondence to: Dr. Yu Wang, The General Surgery Center of PLA, General Hospital of Chengdu Military Command, Tian Hui Town, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. Wangyu666@Hotmail.com  
Received: 2002-03-05 Accepted: 2002-08-23

### Abstract

AIM: To study the effect of OFR (oxygen-derived free radicals) and calcium on the activation of p38 MAPK in isolated rabbit liver during cold preservation and reperfusion period.

METHODS: Based on the cold preservation-reperfusion model of isolated rabbit liver, isolated livers were divided into 4 groups according to the concentration of allopurinol or verapamil in the preservation solution. Liver tissue samples were harvested at the time points of before cold preservation, at the end of cold preservation, and during reperfusion period (5 min, 10 min, 60 min, 120 min). The phosphorylation level of p38MAPK and its activity in liver tissue were detected by Western-Blotting and immunoprecipitation respectively. The content of OFR and concentration of intracellular calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) were also measured by the corresponding method.

RESULTS: The content of OFR was increased to its peak value at 5 min during reperfusion period, the difference among the four groups was significant (groups A, B, C, D:  $2.32 \pm 0.22$ ,  $1.82 \pm 0.15$ ,  $1.63 \pm 0.11$ ,  $1.29 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ ,  $t = 2.57$ ). At 10 min during reperfusion period, the phosphorylation level and its activity of p38MAPK reached its peak value, and there was significant difference among the four groups (Groups A, B, C, D: p38MAPK phosphorylation level ( $76.2 \pm 7.0$ ,  $61.4 \pm 5.9$ ,  $47.3 \pm 2.5$ ,  $37.7 \pm 3.0$ ,  $P < 0.05$ ,

$t = 2.61$ . Groups A, B, C, D: p38MAPK activity)  $82.7 \pm 6.8$ ,  $69.7 \pm 5.2$ ,  $54.5 \pm 5.5$ ,  $41.2 \pm 3.1$ ,  $P < 0.05$ ,  $t = 2.61$ . Groups A, E, F, G: p38MAPK phosphorylation level ( $80.3 \pm 8.7$ ,  $63.3 \pm 4.2$ ,  $50.4 \pm 5.6$ ,  $39.2 \pm 5.7$ ,  $P < 0.05$ ,  $t = 2.61$ . Groups A, E, F, G: p38MAPK activity ( $80.8 \pm 8.9$ ,  $66.7 \pm 4.2$ ,  $53.7 \pm 4.1$ ,  $39.4 \pm 5.5$ ,  $P < 0.05$ ,  $t = 2.61$ ). The peak value of OFR content and  $[Ca^{2+}]_i$  was significantly and positively correlated with the peak value of p38MAPK phosphorylation level and activity ( $P < 0.05$ ,  $R_{OFR} = 0.976$ ,  $R_{Ca} = 0.970$ ).

CONCLUSION: Allopurinol can significantly inhibit the OFR content of isolated liver tissues while verapamil can significantly inhibit the overload of  $Ca^{2+}$  concentration of isolated liver cells. The OFR content and overload of intracellular calcium concentration are closely related with p38MAPK activation during cold preservation and reperfusion period. So activation of p38MAPK signal pathway may be an important mechanism of OFR and  $Ca^{2+}$ , which play a critical role in the ischemia-reperfusion injury of donor liver.

Wang Y, Tian FZ, Tang LJ, Zhang XQ. Effect of OFR and  $[Ca^{2+}]_i$  on the activation of p38 MAPK in isolated rabbit liver during cold preservation and reperfusion period. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(11):1694-1698

### 摘要

目的: 了解离体肝脏缺血再灌注期间氧自由基及钙离子超载是否是激活p38MAPK的因素之一, 为进一步揭示肝脏缺血再灌注损伤的信号转导机制打下基础.

方法: 通过自行建立的兔离体肝脏缺血再灌注模型, 根据冷保存液中别嘌呤醇浓度的不同分为A、B、C、D 4组; 根据冷保存液中维拉帕米浓度的不同又分为E、F、G、H 4组; 分别于离体前、冷保存末及再灌注5 min、10 min、60 min、120 min获取离体肝组织, 分别应用免疫印迹杂交(western-blot)和免疫沉淀法测定磷酸化p38MAPK的表达及活性水平; 并进行肝组织内氧自由基(oxygen free radicals, OFR)含量的测定(A、B、C、D组); 用Fura-2/AM负载法进行肝细胞内钙离子浓度测定(A、E、F、G组).

结果: 于再灌注5 min各组离体肝组织的氧自由基水平升高至峰值, 但各组两两之间存在显著性差异(A、B、C、D组:  $2.32 \pm 0.22$ ,  $1.82 \pm 0.15$ ,  $1.63 \pm 0.11$ ,  $1.29 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ ,  $t = 2.57$ ); 于再灌注10 min供肝组织p38MAPK磷酸化水平及活性均升高至峰值, 但各组两两之间存在显著性差异(A、B、C、D组p38MAPK磷酸化水平:  $76.2 \pm 7.0$ ,  $61.4 \pm 5.9$ ,  $47.3 \pm 2.5$ ,  $37.7 \pm 3.0$ ,  $P < 0.05$ ,  $t = 2.61$ ; A、B、C、D组p38MAPK活性水平:  $82.7 \pm 6.8$ ,  $69.7 \pm 5.2$ ,

54.5 ± 5.5, 41.2 ± 3.1,  $P < 0.05$ ,  $t = 2.61$ ; A、E、F、G 组 p38MAPK 磷酸化水平: 80.3 ± 8.7, 63.3 ± 4.2, 50.4 ± 5.6, 39.2 ± 5.7,  $P < 0.05$ ,  $t = 2.61$ ; A、E、F、G 组 p38MAPK 活性水平: 80.8 ± 8.9, 66.7 ± 4.2, 53.7 ± 4.1, 39.4 ± 5.5,  $P < 0.05$ ,  $t = 2.61$ ); 再灌注 5 min 时氧自由基及 $[Ca^{2+}]_i$ 越高的离体肝, 则再灌注 10 min 时离体肝组织 p38 活性峰值越高, 二者之间呈显著性相关关系 ( $P < 0.05$ ,  $R_{OFR} = 0.976$ ,  $R_{Ca} = 0.970$ )

结论: 别嘌呤醇能显著性抑制离体肝缺血再灌注期间肝组织内 OFR 水平, 而维拉帕米能显著性抑制离体肝缺血再灌注期间肝细胞内钙离子浓度超载; 而且 OFR 水平及钙离子与离体肝组织 p38MAPK 的激活密切相关。

王雨, 田伏洲, 汤礼军, 张晓琼. 冷保存再灌注期间离体肝组织内氧自由基及 $[Ca^{2+}]_i$ 对 p38MAPK 激活的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(11):1694-1698  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1694.asp>

## 0 引言

目前已发现 p38 MAPK 能被致炎细胞因子、砷盐、热休克、高渗、氧自由基、放射线、抗肿瘤药物等物理和化学应激激活<sup>[1-3]</sup>; 并参与了许多疾病过程, 如在急性胰腺炎<sup>[4]</sup>、肿瘤生长<sup>[5]</sup>及炎症反应<sup>[6]</sup>中均起重要作用; 供肝缺血再灌注期间也存在众多的应激因素: 缺血、缺氧、细胞胞质内游离钙离子超载<sup>[7]</sup>; 能量耗竭<sup>[8]</sup>; 微循环紊乱<sup>[9]</sup>等, 有关 p38MAPK 在肝脏缺血再灌注期间能否被却鲜见报道<sup>[10]</sup>. 而在以上应激因素中氧自由基及钙离子在起始缺血再灌注损伤中起重要作用, 因此本实验将重点研究氧自由基及钙离子对 p38 激酶的表达及活性的影响。

## 1 材料和方法

1.1 材料 高速冷冻离心机(Beckman GS-15R), 紫外分光光度仪(Beckman), 电泳仪、垂直电泳槽、转移槽及紫外凝胶分析系统均为 Bio-Rad 公司. 羊抗小鼠 p38 抗体、抗羊 IgG/HRP、生物素 Marker 及抗生物素 IgG/HRP (Santa-Cruz 公司), 兔抗小鼠 p38 磷酸化抗体、羊抗小鼠 p38 非磷酸化抗体、抗兔 IgG/HRP 及 p38 激酶活性测定试剂盒(BioLab), PVDF 膜与化学发光试剂(NEN)、别嘌呤醇、丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(南京建成生物工程研究所), 维拉帕米、RPMI-1640 (GIBCO 公司)、Fura-2/AM(中国医学科学院药物研究所)、乙二醇双(α-氨基乙基)醚四乙酸(EGTA)、L-谷氨酰胺(EMK 进口分装)

1.2 方法 (1)动物分组健康成年新西兰大耳白兔 84 只(由四川省医药实验动物中心提供), 雌雄不限, 体重 2.2-2.7 kg, 随机均分为供体组( $n = 42$ )和受体组( $n = 42$ ). 根据原位灌注液及保存液中别嘌呤醇的浓度或维拉帕米的浓度, 再将供体组分为 7 组. A 组( $n = 6$ )对照组, Euro-collins 液中不加别嘌呤醇及维拉帕米; B 组( $n = 6$ );

Euro-collins 液中加入别嘌呤醇, 浓度为 1 mmol/L; C 组( $n = 6$ ): 别嘌呤醇浓度 5 mmol/L. D 组( $n = 6$ ): 别嘌呤醇浓度为 10 mmol/L. E 组( $n = 6$ ): Euro-collins 液中加入维拉帕米, 浓度为 0.6 mg/100 ml; F 组( $n = 6$ ): 维拉帕米浓度为 1.2 mg/100 ml. G 组( $n = 6$ ): 维拉帕米浓度为 1.8 mg/100 ml.

(2) 模型制备参照 Jamieson et al<sup>[11]</sup>介绍的方法进行离体兔肝的原位灌注及切取. 将切取的离体肝称重后, 立即置于盛有 200 ml 4 °C Euro-collins 液无菌器皿内, 冷保存 6 h 后, 再按下面方法再灌注 2 h.

受体兔麻醉后(戊巴比妥钠, 30 mg/kg 体重, 自耳缘静脉注入), 自正中中线切开腹壁进入腹腔. 解剖、游离左肾动、静脉. 将一根长 12.0 cm, 内径 1.0 mm 的硅胶管由左肾动脉插入腹主动脉内; 将另一根长 12.0 cm、内径为 3.0 mm 的硅胶管自左肾静脉插入下腔静脉内, 钳夹游离端备用. 将待灌注的离体肝门静脉及肝下腔静脉分别与受体兔的左肾动脉、左肾静脉插管相连接(供肝的肝动脉、肝上下腔静脉已结扎), 解除插管钳夹, 恢复供肝血流. 有关上述兔肝保存, 再灌注模型制备的具体方法详见文献[12]报道。

分别于离体前、保存末、再灌注 5 min、10 min、60 min 及 120 min 时, 自供肝左侧叶前缘获取适量组织标本立即存放于液氮中备用, 待后进行氧自由基相关指标、磷酸化 p38MAPK 表达及活性检测. (3) 检测指标及方法: (a) 离体肝组织氧自由基相关指标测定 A、B、C、D 组进行氧自由基相关指标测定, 具体操作方法按南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书进行. (b) 离体肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 测定 A、E、F、G 组离体肝细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定根据 Fura-2/AM 负载法进行. 具体操作方法按文献[3]报道进行. (c) 磷酸化 p38MAPK 的表达及活性测定提取离体肝组织总蛋白并进行蛋白定量; 然后用 Western blot 方法测定 p38MAPK 表达水平; 用免疫沉淀法测定 p38MAPK 活性. 所得图片经 Bio-Rad 图像分析仪进行分析. 以相应蛋白条带的平均光强度值(mean value intensity, MVI)来表示 p38MAPK 表达及活性的相对强度。

统计学处理 数据均采用采用均数 ± 标准差形式, Microsoft Excel 2000 统计软件进行 t 检验,  $P < 0.05$  为差异显著;  $P < 0.01$  为差异非常显著。

## 2 结果

2.1 离体肝组织 SOD 活性 离体前及冷保存末四组离体肝组织 SOD 活性间无显著性差异. 再灌注 5 min 时, 各组离体肝 SOD 活性显著下降, 而后逐渐恢复, 于再灌注 120 min 时, 除 A 组外, 其余三组 SOD 活性均基本恢复至正常水平. 再灌注期间各组离体肝组织 SOD 水平均表现为  $D > C > B > A$ , 各时相点 B、C、D 组均显著性高于 A 组(表 1).

2.2 离体肝组织 MDA 含量 四组离体肝组织 MDA 含量于离体前和冷保存末相较均无显著性差异( $P > 0.05$ ). 再

灌注 5 min 时, 各组离体肝 MDA 含量显著升高, 而后逐渐下降, 于再灌注 120 min 时, 除 A 组外, 其余三组 SOD 活性均基本下降至正常水平. 再灌注期间各组离体肝组织 MDA 水平均表现为 D<C<B<A, 各时相点 B、C、D 三组均显著性低于 A 组(表 2).

2.3 离体肝细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 变化四组离体肝细胞的[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 于离体前和冷保存未彼此间无显著性差异(P >0.05); 再灌注期间, 离体肝细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 于各时相点均有 A>E>F>G 组, 同时相点 A 组[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 水平显著高于其他三组(P <0.05 或 P <0.01); 各组离体肝细胞的[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 水平均于再灌注 5 min 升到峰值, 而后逐渐下降, 到再灌注 120 min 时, C、D 组[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 恢复至正常水平(表 3).

2.4 离体肝组织磷酸化 p38 蛋白的表达及活性 磷酸化 p38 的表达及活性于离体前和冷保存未无显著性差异; 而

再灌注早期各组 p38 磷酸化水平均显著升高, 于 10 min 达到峰值; 60 min 及 120 min 时明显下降; 于再灌注期间, A、B、C、D 4 组内(或 A、E、F、G 4 组内) 两两间存在显著性差异, 表现为 A>B>C>D (P <0.05 或 P <0.01)或 A>E>F>G (P <0.05 或 P <0.01), (表 4、5).

2.5 离体肝组织 p38MAPK 活性与氧自由基相关指标 (SOD、MDA) 及钙离子浓度的相关性分析 再灌注 5 min 及 10 min MDA 含量与再灌注 10 min 肝组织 p38 活性呈显著性正相关(R<sub>5</sub> = 0.984, P <0.05; R<sub>10</sub> = 0.976, P <0.05); 而 p38 活性与 SOD 活性呈显著性负相(R<sub>5</sub> = -0.995, P <0.05; R<sub>10</sub> = -0.97, P <0.05).

再灌注 5 min 时[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 越高的离体肝, 则再灌注 10 min 时离体肝组织 p38MAPK 活性峰值越高, 二者间呈显著性相关关系(R<sub>5</sub> = 0.990, P <0.05; R<sub>10</sub> = 0.971, P <0.05).

表 1 三组离体肝缺血再灌注期间 SOD 活性变化 (NU/mg<sup>-1</sup>/pr<sup>-1</sup>)

组别	离体前	冷保存未	再灌注 (min)			
			5	30	60	120
A	101.5 ± 16.2	89.6 ± 15.5	38.5 ± 5.5	46.5 ± 8.6	68.5 ± 9.7	78.1 ± 9.7
B	100.2 ± 13.5	92.9 ± 13.6	53.7 ± 6.9 <sup>a</sup>	62.3 ± 8.1 <sup>a</sup>	82.2 ± 8.8 <sup>a</sup>	96.9 ± 14.1 <sup>a</sup>
C	100.9 ± 15.0	94.2 ± 13.7	68.5 ± 9.6 <sup>ab</sup>	79.6 ± 6.4 <sup>ab</sup>	90.4 ± 10.4 <sup>a</sup>	99.6 ± 6.6 <sup>a</sup>
D	98.5 ± 8.1	95.8 ± 11.1	83.0 ± 8.7 <sup>abc</sup>	92.7 ± 10.9 <sup>abc</sup>	97.8 ± 8.1 <sup>ab</sup>	101.9 ± 17.5 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P <0.05 vs 同时相点 A 组; <sup>b</sup>P <0.05 vs 同时相点 B 组; <sup>c</sup>P <0.05 vs 同时相点 C 组.

表 2 三组离体肝缺血再灌注期间 MDA 含量变化(nmol/mg<sup>-1</sup>/pr<sup>-1</sup>)

组别	离体前	冷保存未	再灌注 (min)			
			5	30	60	120
A	1.12 ± 0.09	1.11 ± 0.10	2.32 ± 0.22	1.86 ± 0.18	1.57 ± 0.14	1.46 ± 0.13
B	1.09 ± 0.10	1.07 ± 0.10	1.82 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.61 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.35 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.23 ± 0.14 <sup>a</sup>
C	1.08 ± 0.13	1.11 ± 0.10	1.63 ± 0.11 <sup>ab</sup>	1.46 ± 0.10 <sup>ab</sup>	1.27 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.14 ± 0.11 <sup>a</sup>
D	1.12 ± 0.10	1.08 ± 0.08	1.29 ± 0.10 <sup>abc</sup>	1.21 ± 0.18 <sup>abc</sup>	1.15 ± 0.13 <sup>ab</sup>	1.09 ± 0.07 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>P <0.05 vs 同时相点 A 组; <sup>b</sup>P <0.05 vs 同时相点 B 组; <sup>c</sup>P <0.05 vs 同时相点 C 组.

表 3 四组离体肝细胞缺血再灌注期间[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 变化(nmol/L<sup>-1</sup>)

组别	离体前	冷保存未	再灌注 (min)			
			5	10	60	120
A	127.1 ± 18.3	134.6 ± 13.9	297.3 ± 31.9	262.5 ± 17.1	215.2 ± 14.6	187.1 ± 19.2
E	127.3 ± 20.4	135.7 ± 19.3	208.1 ± 21.6 <sup>a</sup>	182.9 ± 26.8 <sup>a</sup>	165.7 ± 24.9 <sup>a</sup>	147.6 ± 8.0 <sup>a</sup>
F	125.8 ± 19.1	135.8 ± 18.3	174.3 ± 14.6 <sup>ab</sup>	149.2 ± 10.5 <sup>ab</sup>	136.5 ± 21.0 <sup>ab</sup>	128.2 ± 11.3 <sup>ab</sup>
G	127.1 ± 13.9	134.9 ± 19.2	140.6 ± 17.0 <sup>abef</sup>	127.8 ± 14.8 <sup>abef</sup>	127.2 ± 13.4 <sup>abef</sup>	126.6 ± 13.1 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>P <0.05 vs 同时相点 A 组; <sup>b</sup>P <0.05 vs 同时相点 E 组; <sup>f</sup>P <0.05 vs 同时相点 F 组.

表 4 别嘌呤醇对再灌注 10 min 时各组离体肝 p38 磷酸化及活性水平的影响

组别	正常对照	A	B	C	D
磷酸化水平(MVI)	6.1 ± 0.9	76.2 ± 7.0 <sup>a</sup>	61.4 ± 5.9 <sup>ab</sup>	47.3 ± 2.5 <sup>abcd</sup>	37.7 ± 3.0 <sup>abcd</sup>
活性水平(MVI)	8.1 ± 1.2	82.7 ± 6.8 <sup>a</sup>	69.7 ± 5.2 <sup>ab</sup>	54.5 ± 5.5 <sup>abc</sup>	41.2 ± 3.1 <sup>abcd</sup>

<sup>a</sup>P <0.05 vs 正常对照组; <sup>b</sup>P <0.01 vs A 组; <sup>c</sup>P <0.05 vs B 组; <sup>d</sup>P <0.05 vs C 组.

表 5 维拉帕米对再灌注 10 min 时离体肝 p38 磷酸化及活性水平的影响

组别	正常对照	A	E	F	G
磷酸化水平(MVI)	5.5 ± 1.7	80.3 ± 8.7 <sup>a</sup>	63.3 ± 4.2 <sup>ab</sup>	50.4 ± 5.6 <sup>abc</sup>	39.2 ± 5.7 <sup>abcd</sup>
活性水平(MVI)	9.1 ± 3.5	80.8 ± 8.9 <sup>a</sup>	66.7 ± 4.2 <sup>ab</sup>	53.7 ± 4.1 <sup>abc</sup>	39.4 ± 5.5 <sup>abcd</sup>

<sup>a</sup>P <0.05 vs 正常对照组; <sup>b</sup>P <0.01 vs A 组; <sup>c</sup>P <0.05 vs E 组; <sup>d</sup>P <0.01 vs F 组.

### 3 讨论

在肝移植研究领域, 既往大量的研究已证实肝细胞内钙离子超载及氧自由基(OFR)过量产生是供肝低温保存-再灌注过程中组织细胞坏死性变化的两个基本病理机制<sup>[13-16]</sup>. OFR 可直接与细胞膜发生脂质过氧化反应, 造成膜通透性障碍; 还可直接作用于 DNA, 使其断裂, 引发细胞凋亡<sup>[17]</sup>. 钙超载可激活细胞内磷脂酶、蛋白酶等, 导致膜性结构破坏; 促进氧自由基产生, 线粒体钙超载使其呼吸功能受损; 激活内源性核酸内切酶, 引起 DNA 断裂<sup>[18]</sup>. 而且钙超载被认为是缺血-再灌注损伤的始动因素<sup>[19]</sup>. 但这二者造成组织细胞损伤的机制还未完全清楚. 已证实, 别嘌呤醇能抑制 OFR 的产生, 而维拉帕米是细胞钙通道阻滞剂, 能阻断细胞内钙离子水平的升高; 这二者常用在研究中来阐明 OFR 及钙离子作用机制. 本部分实验用别嘌呤醇和维拉帕米的目的在于通过其抑制供肝组织 OFR 及钙离子水平, 来探讨 OFR 及钙离子对 p38 磷酸化及活性的影响.

目前发现能激活 p38 的因素较多, 如 LPS、茴香霉素、TNF、热休克、紫外线及高渗环境等<sup>[20, 21]</sup>. 一些研究显示<sup>[22-25]</sup>, 氧自由基可激活 p38 通路, 参与靶细胞的损伤过程, 如用  $H_2O_2$  刺激多种培养细胞系如 HeLa、Rat1、NIH3T3 及 PC12 等均能激活 p38. Zhu et al<sup>[26]</sup>发现, 用柔红霉素处理新生小鼠培养心肌细胞, 可导致心肌细胞 p38 激活, 用 OFR 清除剂或钙离子拮抗剂后, p38 活化受到明显抑制, 提示 OFR 与钙离子参与了 p38 的激活. Vereker et al<sup>[27]</sup>发现, 用 IL-1 $\beta$  进行大鼠脑室内注射可引起海马区脑组织 OFR 升高和 p38 活性增高, 用抗氧化剂维生素 E 和维生素 C 喂食后, p38 活性增高被抑制. 这些结果提示 OFR 具有激活 p38 的作用. 本部分实验发现, 供肝组织 OFR 含量与再灌注期间 p38 活性峰值间呈显著性正相关关系, 用别嘌呤醇抑制 OFR 的产生后, 供肝 p38 活性则显著下降, 提示冷保存再灌注期间供肝组织 OFR 能够上调 p38 活性, 供肝组织 OFR 含量越高, 则 p38 活性也越高.

最近的文献表明, p38 的激活与钙离子也密切相关<sup>[28-31]</sup>. Conrad et al<sup>[30]</sup>发现, 缺氧能引起 PC12 细胞 p38 的激活; 通过进一步的研究, 发现去除培养基中的钙离子或应用钙调蛋白拮抗剂 W13 后, 缺氧环境中 PC12 细胞 p38 激活被阻断, 提示钙离子参与了缺氧引发的 p38 激活过程, 且在 p38 的上游起调节作用. Lee et al<sup>[32]</sup>发现, 在 PC12 培养细胞, 细胞内钙离子浓度升高后 5 min 内 p38 即被活化, 这种钙离子对 p38 的激活能被钙调蛋白特异性拮抗剂 W13 或 calmidazolium 所抑制, 提示钙离子激活 p38 具有钙调蛋白依赖性. 本部分实验结果显示, 供肝细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 与再灌注期间 p38 活性峰值呈显著性正相关关系, 用维拉帕米降低供肝细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 水平后, 供肝 p38 活性即显著降低, 提示冷保存再灌注期间供肝细胞内钙离子能够上调 p38 活性, 且钙离子浓度越高, p38 活性越高.

本部分实验结果发现, OFR 及钙离子对磷酸化 p38 的表达水平也有显著性影响, OFR 及钙离子能上调磷酸化 p38 蛋白的表达, 而 p38 的磷酸化是其产生底物酶活性的必要条件, 提示 OFR 及钙离子上调供肝 p38 活性的作用至少发生在磷酸化水平, 因此说明 OFR 及钙离子对冷保存再灌注期间供肝 p38 具有激活作用.

### 4 参考文献

- Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994;265:808-811
- Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 1996;271:17920-17926
- 姜勇, 刘爱华, 张琳, 赵克森. 脂多糖激活 p38 在诱导肿瘤坏死因子  $\alpha$  基因表达中的作用. *中华医学杂志* 1999;79:360-364
- Fleischer F, Dabew R, Goke B, Wagner ACC. Stress kinase inhibition modulates acute experimental pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2001;7:259-265
- 毛华, 袁爱力, 赵敏芳, 赖卓胜, 张亚历, 周殿元. P38MAPK 信号通路影响血管内皮细胞生长因子诱导肝癌细胞超微结构变化. *世界华人消化杂志* 2000;8:536-538
- Meng AH, Ling YL, Zhang XP, Zhang JL. Anti-inflammatory effect of cholecystokinin and its signal transduction mechanism in endotoxic shock rat. *World J Gastroenterol* 2002;8:712-717
- Uchida M, Takemoto Y, Nagasue N, Kimoto T, Dhar DK, Nakamura T. Calcium in pig livers following ischemia and reperfusion. *J Hepatol* 1994;20:714-719
- Astarcioğlu I, Adam R, Dimicoli JL, Gigou M, Patry J, Sebah M, Bismuth H. Protective effect of alanine against graft failure of transplanted livers from fasted donor rats. *Transplant Proc* 1995;27:507-508
- Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Takeuchi Y, Harada A, Nakao A, Takagi H. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995;59:772-779
- Kiemer AK, Kulhanek-Heinze S, Gerwig T, Gerbes AL, Vollmar AM. Stimulation of p38 MAPK by hormonal preconditioning with atrial natriuretic peptide. *World J Gastroenterol* 2002;8:707-711
- Jamieson NV, Lindell S, Sundberg R, Southard JH, Belzer FO. An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver. *Transplantation* 1988;46:512-516
- 汤礼军, 田伏洲, 王雨, 黄大熔, 周树, 胡建中. 兔肝脏保存-再灌注损伤模型的建立及评价. *肝胆外科杂志* 1998;6:123-125
- Koepffel TA, Lehmann TG, Thies JC, Gehrcke R, Gebhard MM, Herfarth C, Otto G, Post S. Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1996;61:1397-1402
- Stefanovich P, Ezzell RM, Sheehan SJ, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M. Effects of hypothermia on the function, membrane integrity, and cytoskeletal structure of hepatocytes. *Cryobiology* 1995;32:389-403
- Gao W, Connor HD, Lemasters JJ, Mason RP, Thurman RG. Primary nonfunction of fatty livers produced by alcohol is associated with a new antioxidant-insensitive free radical species. *Transplantation* 1995;59:674-679
- Kusumoto K, Morimoto T, Minor T, Uchino J, Isselhard W. Allopurinol effects in rat liver transplantation recovery of energy metabolism and free radical-induced damage. *Eur Surg Res* 1995;27:258-291
- Shah KA, Shurey S, Green CJ. Apoptosis after intestinal ischemia-reperfusion injury: a morphological study. *Transplantation* 1997;64:1393-1397

- 18 Mizuno N, Yoshitomi H, Ishida H, Kuromi H, Kawaki J, Seino Y, Seino S. Altered bcl-2 and bax expression and intracellular  $Ca^{2+}$  signaling in apoptosis of pancreatic cells and the impairment of glucose-induced insulin secretion. *Endocrinology* 1998; 139:1429-1439
- 19 卢绮萍, 史陈让, 陈孝平, 蔡逊, 李德忠, 张兆林, 易继林, 武小华. 影响肝缺血再灌注损伤主导因素的机制. *中华实验外科杂志* 1996;13:369-370
- 20 姜勇, 韩家淮. P38 MAPK 信号转导通路. *生命科学* 1999;11: 102-106
- 21 姜勇, Ulevitch RJ. LPS 介导细胞激活的信号转导: 从 CD14 到 p38MAPK 通路的研究. *生理科学进展* 1999;30:29-34
- 22 Jaspers I, Samet JM, Erzurum S, Reed W. Vanadium-induced kappaB-dependent transcription depends upon peroxide-induced activation of the p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:95-102
- 23 Guha M, Bai W, Nadler JL, Natarajan R. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 2000;275: 17728-17739
- 24 Rao GN. Oxidant stress stimulates phosphorylation of eIF4E without an effect on global protein synthesis in smooth muscle cells. Lack of evidence for a role of H2O2 in angiotensin II-induced hypertrophy. *J Biol Chem* 2000;275:16993-16999
- 25 Boland S, Bonvallot V, Fournier T, Baeza-Squiban A, Aubier M, Marano F. Mechanisms of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:L25-32
- 26 Zhu W, Zou Y, Aikawa R, Harada K, Kudoh S, Uozumi H, Hayashi D, Gu Y, Yamazaki T, Nagai R, Yazaki Y, Komuro I. MAPK superfamily plays an important role in daunomycin-induced apoptosis of cardiac myocytes. *Circulation* 1999; 100:2100-2107
- 27 Vereker E, O'Donnell E, Lynch MA. The inhibitory effect of interleukin-1beta on long-term potentiation is coupled with increased activity of stress-activated protein kinases. *J Neurosci* 2000;20:6811-6819
- 28 Mao Z, Bonni A, Xia F, Nadal-Vicens M, Greenberg ME. Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science* 1999; 286:785-790
- 29 Sodhi CP, Battle D, Sahai A. Osteopontin mediates hypoxia-induced proliferation of cultured mesangial cells: role of PKC and p38 MAPK. *Kidney Int* 2000;58:691-700
- 30 Conrad PW, Millhorn DE, Beitner-Johnson D. Hypoxia differentially regulates the mitogen- and stress-activated protein kinases. Role of  $Ca^{2+}$ /CaM in the activation of MAPK and p38 gamma. *Adv Exp Med Biol* 2000;475:293-302
- 31 Jope RS, Zhang L, Song L. Peroxynitrite modulates the activation of p38 and extracellular regulated kinases in PC12 cells. *Arch Biochem Biophys* 2000;376:365-370
- 32 Lee SA, Park JK, Kang EK, Bae HR, Bae KW, Park HT. Calmodulin-dependent activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases contributes to c-fos expression by calcium in PC12 cells: modulation by nitric oxide. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;75:16-24

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 读者来信 •

总编:

我的英文稿件, 编号为 888, 也从大宗病例阐述了门脉高压不同手术方式的适应证, 对临床有指导意义, 这是国内著名专家多年临床经验的总结. 对于此稿件的退稿, 我很遗憾和难过. 但是, 我接受现实, 也对贵刊严格要求表示钦佩. 这毕竟是国内影响力最高的著名医学期刊, 需要全体同仁的精心呵护.

我在第三军医大学毕业后留在了西南医院肝胆外科中心, 前后共跟随导师蔡景修教授、董家鸿教授、何振平教授工作了 8 a, 获得了博士学位. 主要从事门脉高压、肝硬化的临床和实验研究, 为蔡景修教授做了许多临床统计和实验研究, 因此, 蔡景修教授申请的军队医疗成果二等奖也有我的署名. 此稿件的翻译曾经争得了他的同意. 他老人家还同意我以后将我所做的文章在北京申报科技成果奖.

贵刊登载有关门脉高压症的手术治疗的文章太少. 而我国是肝炎大国, 也是肝硬化门静脉高压病的大国, 此类手术非常多, 手术适应证的掌握有待于研讨. 而此篇 (888 号英文稿件) 侧重于临床适应证的总结, 有助于国外同行了解中国同仁的经验. 适当增加临床文章或者紧密结合临床的实验文章, 也能够增加杂志的可读性. 国外类似的杂志也登载了不少临床文章及紧密结合临床的实验文章. 如果觉得我作为第一作者不合适, 可以将蔡景修教授作为第一作者. 或者我再把人民医院的类似病例加进去, 增加病例数量, 完善文章结构, 仔细斟酌语言, 然后再投, 如何?

我是第一次投 WJG, 所以, 有不妥之处敬请见谅. 但是我不知道我的那篇文章内容在扩充病例、仔细修改或者更换蔡景修教授为第一作者之后, 还可不可以投稿. 也就是此文章的内容是否能够接受? 在百忙之中可否简单答复?

另有一点建议及想法. 目前, 医务工作者发文章很艰难, 主要是研究生年年扩招, 而杂志没有增加几个, 以至于核心期刊只能刊登来稿的几分之一, 甚至连国家资助的研究项目也经常被拒稿. 您若能乘借此两种杂志的成功, 再创办呼吸、循环等类的杂志, 形成系列, 岂不很好? 如不妥, 权当笑谈.

(徐新保 2003-10-08)