

DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2013.07.012

# p38MAPK 抑制剂 SB202190 体外对细粒棘球蚴原头节的作用

张晶<sup>1</sup>, 吕海龙<sup>2</sup>, 王成华<sup>1</sup>, 孙冯<sup>1</sup>, 雷颖<sup>1</sup>, 彭心宇<sup>2</sup>, 姜玉峰<sup>1</sup>

**摘要:**目的 探讨 p38MAPK 抑制剂 SB202190 体外抑制细粒棘球蚴原头节生长的作用。方法 将体外培养的细粒棘球蚴原头节分别加入 12.5、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  的 SB202190 中体外孵育。利用伊红染色的方法,在光镜下观察原头节的活力变化。实验重复 3 次;扫描电子显微镜下(SEM)下观察 SB202190 作用后原头节表面超微结构改变;不同浓度 SB202190 作用 24 h 后,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)活性检测试剂盒检测 caspase-3 酶活性。结果 50  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$  的 SB202190 作用 1 d 后,头节活力开始下降。作用 14 d 后,100  $\mu\text{mol/L}$  SB202190 组无存活的原头节,50  $\mu\text{mol/L}$  SB202190 组的头节活力仅为 13.8%。超微结构显示 100  $\mu\text{mol/L}$  SB202190 作用 6 d 后,原头节顶突外翻、变形,顶突界面缺损,吸盘变形,体表出现虫蛀样损害。不同浓度 SB202190 作用 24 h 后,与正常对照组比较,SB202190 高浓度组原头节的 caspase-3 表达明显增高。结论 p38MAPK 抑制剂 SB202190 在体外有明显的抑制细粒棘球蚴原头节生长的作用。

**关键词:** p38MAPK 抑制剂;细粒棘球蚴原头节;体外实验

中图分类号: R383.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2013)07-0700-04

## *In vitro* effects of p38MAPK inhibitor SB202190 on *Echinococcus granulosus* protoscoleces

ZHANG Jing<sup>1</sup>, LV Hai-long<sup>2</sup>, WANG Cheng-hua<sup>1</sup>, SUN Feng<sup>1</sup>, LEI Ying<sup>1</sup>, PENG Xin-yu<sup>2</sup>, JIANG Yu-feng<sup>1</sup>

(1. Department of Histology and Embryology, Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008, China;

2. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008, China)

**ABSTRACT:** The aim of this study was to investigate the *in vitro* efficacy of the p38MAPK inhibitor SB202190 against *Echinococcus granulosus* protoscoleces. Protoscoleces of *Echinococcus granulosus* were incubated with SB202190 at concentrations of 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$ , and the effects on protoscoleces viability were monitored by 0.1% eosin staining and light microscopic inspection. Each experiment was repeated for three times. Starting from day 1 of incubation in the presence of 50  $\mu\text{mol/L}$  and 100  $\mu\text{mol/L}$  SB202190, viability of protoscoleces started to decline depending on the concentration of the inhibitors. After 14 days of incubation in 100  $\mu\text{mol/L}$  of SB202190, no survival protoscolece remained but 13.8% survival protoscoleces were found in 50  $\mu\text{mol/L}$  of SB202190 after 14 days. At the same time, ultrastructural effects of protoscoleces were observed by scanning electron microscopy (SEM), the morphological changes included contraction of the soma region, formation of blebs on the tegument, and rostellar disorganization. Additionally, caspase-3 was detected in protoscoleces and the result showed that the activity of caspase-3 was found higher in protoscoleces incubated with SB202190 as compared to the control protoscoleces. The data reported in this article demonstrate a clear *in vitro* effect of SB202190 against *E. granulosus* protoscoleces.

**KEY WORDS:** p38MAPK inhibitor; *Echinococcus granulosus* protoscoleces; *in vitro*

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30960338), the Xinjiang Production and Construction Corps Foundation (Nos. 2011BB019 & 2011BA058), and the Shihezi University Foundation (Nos. RCZX200925 & LHJJ2010B10)联合资助

通讯作者: 姜玉峰, Email: yufengjiang03@126.com

作者单位: 1. 石河子大学医学院组织胚胎学教研室, 石河子 832008;

2. 石河子大学第一附属医院肝胆外科, 石河子 832008

Corresponding author: Jiang Yu-feng, Email: yufengjiang03@126.com

细粒棘球蚴病(echinococcosis)又称囊性包虫病(cystic echinococcosis, CE),是由细粒棘球蚴绦虫(*Echinococcus granulosus*, Eg)的中绦期幼虫所致的一种严重危害人民健康和畜牧业发展的人兽共患寄生虫病。目前,手术仍然是治疗肝囊性包虫病的首选方法。彭心宇等<sup>[1]</sup>提出的“闭合式肝包虫外膜内外囊完整摘除术”,大大降低了肝包虫病的术后复发率。但当包虫囊肿体积较大或临近重要管道时,就需要选择开放性外膜内外囊完整摘除术,如果术中有头节的外溢或残留,则会增加术后复发的风险,因此寻找术中中和术后既能有效杀死细粒棘球蚴原头节又不损伤机体和周围健康肝组织的有效制剂成为包虫病防治研究的一项重要课题。

本研究将不同浓度的 p38MPPK 抑制剂 SB202190 体外作用于细粒棘球蚴原头节,观察 SB202190 对细粒棘球蚴原头节活力的影响作用,为囊性包虫病的治疗寻找一个新的靶点。

## 1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂 自然感染细粒棘球蚴病的绵羊肝脏,由新疆石河子市西部牧业有限公司提供。RPMI 1640 培养基和小牛血清购自 GIBCO 公司;SB202190 和二甲基亚砷(DMSO)购自美国 SIGMA 公司。用 DMSO 溶解 SB202190 粉末,用培养液稀释到实验所需浓度(DMSO 终浓度 $<0.1\%$ ),备用。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)活性检测试剂盒购自海门碧云天生物技术研究所在所。

### 1.2 方法

1.2.1 细粒棘球蚴原头节的分离及体外培养 取新鲜的自然感染细粒棘球蚴病的绵羊肝脏,立即带回实验室,清洁羊肝表面,再用 75% 酒精消毒表面,无菌条件下抽取含原头节的囊液,移入无菌瓶中。用 PBS(pH=7.2)清洗原头节 3 次至澄清,用 0.1% 伊红染液做染色排斥实验,98% 以上拒染。肉眼观察原头节呈细白沙样颗粒,倒置显微镜下观察原头节呈内陷型,结构清晰完整,钙颗粒清亮而明显(见图 1A)。然后将原头节分装至含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中(青霉素 100 U/mL,链霉素 100 U/mL),置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。

1.2.2 观察 p38MAPK 特异性抑制剂 SB202190 对体外培养细粒棘球蚴原头节的影响 实验分组为: RPMI 1640 空白对照组、12.5 μmol/L SB202190 组、25 μmol/L SB202190 组、50 μmol/L SB202190 组、100 μmol/L SB202190 组、DMSO 组。取六孔板,每孔设 5 mL 体系,按以上分组,配好相

应的培养液。

将在体外培养 5 d 后的细粒棘球蚴原头节用 PBS(pH7.2)清洗 2 遍,按以上各组,每组培养液中加入约 2 000 个原头节,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育箱内培养。

从加药后 24 h 开始,每组每天均匀抽取 200 μL 培养液(平均所含原头节约 70~90 个),用 0.1% 伊红染色 15 min,倒置显微镜下观察原头节的活力。死亡或活力减弱的原头节红染着色,伴有结构破坏;活头节拒染、不着色,且有活动性。计算每天平均死亡率。每隔 3 d 换液 1 次(每组体系和浓度同第 1 次加药时),连续观察 14 d,直至最大作用浓度的原头节全部死亡。同时选择合适的浓度和时间观察原头节超微结构的变化。实验重复 3 次。

应用 SPSS 13.0 统计软件,采用  $\chi^2$  检验对实验检测的活力数据进行统计分析。根据统计分析的数据,做活力曲线图。

1.2.3 超微结构观察 选择 100 μmol/L SB202190 作用 6 d 组和空白对照组的原头节,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;置 4% 戊二醛固定 24 h。将原头节放入浓度为 50%、70%、80%、90%、100% 的酒精内逐级梯度脱水,脱水时间分别为 5 min、10 min、30 min、1 h 至过夜,临界点干燥,真空喷金 LOOA,置 LEO1430VP 扫描电子显微镜下观察原头节表层超微结构变化。

1.2.4 caspase-3 活性检测 取 12.5、25、50、100 μmol/L 的 SB202190 作用 24 h 后各组细粒棘球蚴原头节,PBS 清洗 3 次后,加液氮研磨,按试剂盒说明,每 3 mg 头节中加入 100 μL 裂解液,在冰浴中放置 10 min,4 °C 1 600 g 离心 15 min 后,吸取上清液。用 Bradford 蛋白浓度测定法测定蛋白浓度,将各组所提蛋白的浓度配平。按说明书反应体系加入酶标板,并设空白组,37 °C 孵育 24 h,用酶标仪检测吸光度(A<sub>405</sub>值)。将实验独立重复 3 次,应用 SPSS 13.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析、组间两两比较采用 SNK 法,对实验检测的数据进行统计学分析。用样品中活化的 caspase-3 催化试剂中无色的四肽化合物 Ac-DEVD-ρNA 产生黄色的对硝基苯胺 ρNA,根据标准曲线和样品的 A<sub>405</sub> 值,计算样品中生成的 ρNA 浓度,由此推测 caspase-3 的活性。

## 2 结果

2.1 倒置显微镜下观察 SB202190 对细粒棘球蚴原头节形态变化的影响 SB202190 高浓度组作用

24 h 后,可见虫体团缩,体积变小。作用 6 d 后,SB202190 低浓度组原头节体积缩小,钙颗粒明显减少;SB202190 高浓度组原头节顶突上的小钩排列紊乱,部分脱落,吸盘变形,伊红染液作染色排斥反应,可见大部分头节结构破坏被红色着染。空白对照组和 DMSO 组原头节顶突凹入或凸出,存活良好,可见原头节活动。

2.2 SB202190 对细粒棘球蚴原头节生长的影响  
经  $\chi^2$  检验对实验检测数据进行统计分析,50  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$  的 SB202190 对原头节的杀伤作用最显著,这两组的原头节死亡率和对照组相比具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),12.5  $\mu\text{mol/L}$  和 25  $\mu\text{mol/L}$  的 SB202190 组与对照组死亡率相比,从作用 6 d 后开始具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。从活力曲线图中可以看出,随着药物浓度的增加和用药时间的延长,原头节的抑制率增加,此作用具有剂量依赖性和时间依赖性。

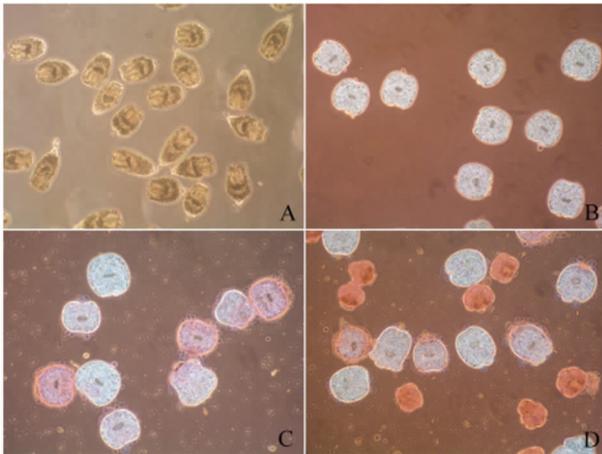


图 1 倒置显微镜下的细粒棘球蚴原头节形态 (100 $\times$ )  
Fig. 1 *E. granulosus* protoscoleces under light microscopy (100 $\times$ )

A: Control protoscoleces; B: Protoscoleces incubated with DMSO; C: Altered protoscoleces after 6 days p. i. with 50  $\mu\text{mol/L}$  SB202190; D: Altered protoscoleces after 6 days p. i. with 100  $\mu\text{mol/L}$  SB202190.

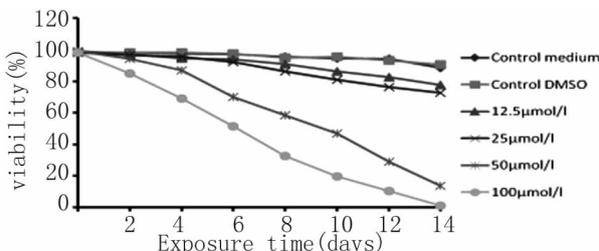


图 2 SB202190 各浓度组体外作用后原头节的活力值  
Fig. 2 Survival of *E. granulosus* protoscoleces after in vitro exposure to SB202190

2.3 原头节超微结构的变化 扫描电子显微镜观察空白对照组原头节表面光滑,多呈内陷型,头节呈球形或椭圆形(见图 3);用 100  $\mu\text{mol/L}$  SB202190 作用细粒棘球蚴原头节 6 d 后,在扫描电子显微镜下观察发现,原头节多呈外翻型,顶突破坏、头钩缺损、吸盘变形,体表出现许多陷窝,皮层呈虫蛀样损害(见图 4)。

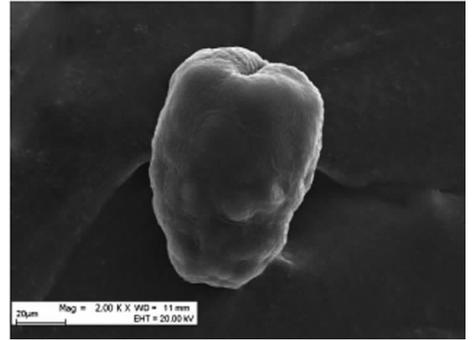


图 3 正常细粒棘球蚴原头节,呈内陷型  
Fig. 3 Invaginated protoscolex

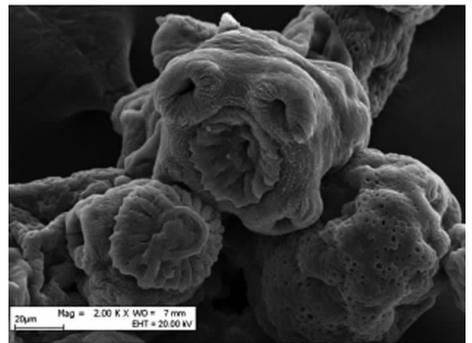


图 4 100  $\mu\text{mol/L}$  SB202190 组培养 6 d,原头节呈外翻型,顶突破坏,体表出现许多陷窝,皮层呈虫蛀样改变  
Fig. 4 Altered protoscoleces after 6 days p. i. with 100  $\mu\text{mol/L}$  SB202190

Markedly tegumental alterations of some region and disorder on the rostellum.

2.4 caspase-3 活性检测 采用单因素方差分析对 caspase-3 活性检测数据进行统计分析,组间比较有统计学差异,  $F = 221.302, P < 0.01$ 。组间两两比较采用 SNK 法,空白组与 DMSO 组、12.5  $\mu\text{mol/L}$  和 25  $\mu\text{mol/L}$  的 SB202190 组之间差异没有显著性意义 ( $P = 0.313$ ),50  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$  的 SB202190 组与其它各组之间差异均有显著性(显著性水准为 0.05)(见表 1)。

### 3 讨论

细粒棘球蚴病可发病于机体的多个部位,以肝脏发病最多见。肝细粒棘球蚴病的治疗主要有手术治疗和药物治疗。目前,外科手术仍然是治疗肝囊

表 1 不同浓度 SB202190 作用于原头节 24 h 后 caspase-3 活性

Tab. 1 Caspase-3 activity in *E. granulosus* protoscoleces after infection with SB202190 at different concentrations for 24 hours

Group	Blank	DMSO	12.5 $\mu\text{mol/L}$ SB202190	25 $\mu\text{mol/L}$ SB202190	50 $\mu\text{mol/L}$ SB202190	100 $\mu\text{mol/L}$ SB202190
A <sub>105</sub> value	0.048 $\pm$ 0.001 6	0.047 $\pm$ 0.001 8	0.047 $\pm$ 0.002 8	0.049 $\pm$ 0.001 5	0.058 $\pm$ 0.001 6	0.073 $\pm$ 0.003
$\rho\text{NA}(\mu\text{mol/L})$	12.02 $\pm$ 0.481	11.724 $\pm$ 0.538	11.725 $\pm$ 0.0.845	12.315 $\pm$ 0.46	14.998 $\pm$ 0.491	19.363 $\pm$ 0.906

Note: the results correspond to the mean  $\pm$  SD from three experiments in duplicate.  $F=221.302$ ,  $P<0.01$  by analysis of one-way ANOVA.

性包虫病最有效的治疗方法<sup>[2]</sup>。但是,对于术中头节外溢的情况,头节的处理不当是导致囊性包虫病复发的重要原因<sup>[3]</sup>。因此,避免头节外溢并用有效的制剂局部辅助用药是降低复发率的根本措施。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)级联是细胞内广泛存在的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶超家族,普遍存在于多种生物。MAPK 信号转导通路是细胞增殖、分化等信息传递途径的交汇点和共同通路。P38MAPK 是 MAPK 信号转导通路中重要一员。大量研究证实 MAPK 信号转导通路与肿瘤发生、发展、侵袭、转移等有密切关系,通过不同途径干预 MAPKs 信号通路的转导过程或强度,可有效抑制肿瘤细胞增殖、分化,延长肿瘤患者的生存时间。在研究中还发现,在一些寄生虫中存在着 MAPK 通路<sup>[4-6]</sup>。

作为多细胞生物,棘球蚴通过信号转导通路,促进细胞之间信息交流,从而来调节其生长与发育<sup>[7]</sup>。Spiliotis 等<sup>[8-11]</sup>在研究中先后从多房棘球蚴绦虫中克隆出 MAPK 信号通路样基因,如 EmRas, EmRaf, EmMKK1, EmMKK2, EmMPK1 等等,发现它们在多房棘球蚴幼虫的发育过程中具有重要作用。吕国栋等的研究结果也表明在细粒棘球蚴的不同发育阶段(原头蚴和成虫)均可以发现 ERK 信号通路成员 EgRAS 和 EgERK1 基因的存在<sup>[12-13]</sup>,虽然两者具体的生物学功能尚不十分清楚,但其研究结果提示,细粒棘球蚴中也可能存在 MAPK 信号通路。

Gelmedin 等<sup>[14]</sup>在多房棘球蚴的研究中鉴定出了一个新的基因 EmMPK2。其生物化学的分析显示, p38MAPK 抑制剂 SB202190 可以有效抑制 EmMPK2 的活性,且呈现浓度依赖性。SB202190 属于细胞渗透性吡啶基咪唑类复合物,是 ATP 竞争性 p38MAPKs 抑制剂。他们用一定浓度的 SB202190 作用于体外培养的多房棘球蚴续绦期囊泡,发现 SB202190 可以使囊泡内的 EmMPK2 去磷酸化,SB202190 对囊泡有明显的破坏作用。

本研究应用 p38MAPK 特异性阻断剂

SB202190 作用于体外培养的细粒棘球蚴原头节,观察 SB202190 对细粒棘球蚴原头节生长的影响。结果显示,随着药物浓度的增加和用药时间的延长,原头节活力的抑制率增加。Paredes 等<sup>[15]</sup>研究表明细粒棘球蚴存在细胞凋亡现象,且检测到不育囊中 caspase-3 活力表达高于可育囊中的。本研究的实验结果显示,在 SB202190 作用于细粒棘球蚴原头节早期,高浓用药组 caspase-3 活力高于对照组。同时超微结构观察显示用药组原头节的结构被显著破坏。以上实验结果表明,SB202190 在体外有显著的抑制细粒棘球蚴原头节生长的作用,且此作用具有剂量依赖性和时间依赖性。

## 参考文献:

- [1]Peng XY, Zhang SJ, Niu JH, et al. A new principle of surgical procedures for hepatic hydatid disease-An analysis of 684 cases [J]. J Abdominal Surg, 2003, 16(1): 19-21. DOI: 10.3969/j.issn.1003-5591.2003.01.008 (in Chinese)  
彭心宇, 张示杰, 牛建华, 等. 肝包虫病外科治疗术式选择的新观点(附 684 例报道)[J]. 腹部外科, 2003, 16(1): 19-21.
- [2]Moazeni M, Alipour-Chaharmahali MR. *Echinococcus granulosus*: *In vitro* effectiveness of warm water on protoscolices[J]. Exp Parasitol, 2011, 127(1): 14-17. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.06.021
- [3]Moazeni M, Nazer A. *In vitro* effectiveness of garlic (*Allium sativum*) extract on scolices of hydatid cyst [J]. World J Surg, 2010, 34(11): 2677-2681. DOI: 10.1007/s00268-010-0718-7
- [4]Rangarajan R, Bei AK, Jethwaney D, et al. A mitogen-activated protein kinase regulates male gametogenesis and transmission of the malaria parasite *Plasmodium berghei* [J]. EMBO Rep, 2005, 6(5): 464-469. DOI: 10.1038/sj.embor.7400404
- [5]Wang L, Yang Z, Li Y, et al. Reconstruction and in silico analysis of the MAPK signaling pathways in the human blood fluke, *Schistosoma japonicum* [J]. FEBS Lett, 2006, 580(15): 3677-3686. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.05.055
- [6]Lacey MR, Brumlik MJ, Yenni RE, et al. *Toxoplasma gondii* expresses two mitogen-activated protein kinase genes that represent distinct protozoan subfamilies [J]. J Mol Evol, 2007, 64(1): 4-14. DOI: 10.1007/s00239-005-0197-x

(下转第 708 页)